

**Apoptotische Neurodegeneration im unreifen Rattengehirn
bis zu zwei Wochen nach Phenobarbital-Applikation
am siebten Lebenstag**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Barbara Merkle
geboren am 20. Januar 1983 in Regensburg**

Gutachter: 1. Prof. Dr. U. Brandl, Jena
 2. Prof. Dr. C. Mawrin, Magdeburg
 3. PD Dr. R. Trollmann, Erlangen

Tag der Promotion: 01. September 2009

Abkürzungsverzeichnis

Ac-DEVD-CHO	Acetyl-Aspartat-Glutamin-Valin-Aspartat-CHO
AMC	7-Amino-4-Methylcumarin
Aqua dest./bidest.	destilliertes/doppelt destilliertes Wasser
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CAD	Caspase-aktivierte Desoxyribonuklease
CB	Cerebellum
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-Propanesulfonic Acid
DG	Gyrus dentatus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxy ribonuclein acid)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid)
EEG	Elektroenzephalogramm
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FC	Frontalcortex
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure (gamma-amino butyric acid)
HC	Hippocampus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
KG	Körpergewicht
MV	Mittelwert (mean value)
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor)
P(7-21)	(7. bis 21.) Lebensstag
Par	Parietalcortex
PB	Phenobarbital
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

Abkürzungsverzeichnis

pH	Potenz (p) und Maß für Wasserstoffionenkonzentration (H)
pK_a	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten eines Elektrolyten
STAB	Standardabweichung
Str	Striatum
Thal	Thalamus
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TUNEL	TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)-mediated dUTP (2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate)-biotin nick end labeling

Inhaltsverzeichnis

0.	Zusammenfassung	6
1.	Einleitung	8
1.1	Wissenschaftlicher Hintergrund dieser Arbeit	8
1.2	Phenobarbital	9
1.3	Apoptose	11
2.	Ziele der Arbeit	15
3.	Methodik	16
3.1	Das Tiermodell	16
3.2	Allgemeiner Versuchsablauf	17
3.3	Tierhaltung und Injektion	17
3.3.1	Versuchstiere	17
3.3.2	Tierhaltung	17
3.3.3	Dosierung des Phenobarbital	19
3.3.4	Injektion der Kontroll- bzw. Phenobarbitallösung	19
3.3.4.1	Kontrolllösung	19
3.3.4.2	Phenobarbitallösung	19
3.3.4.3	Durchführung der Injektion	20
3.4	Hirnentnahme	20
3.5	Nachweis von Apoptose	21
3.5.1	HE-Färbung	22
3.5.1.1	Verwendete Materialien	22
3.5.1.1.1	Geräte und Zubehör	22
3.5.1.1.2	Reagenzien und Lösungen	23
3.5.1.2	Präparation	23
3.6	Auswertung der Hirnschnitte	24
3.6.1	Bestimmung der Zelldichte	25
3.6.2	Bestimmung der Apoptoserate	25
3.7	Statistische Auswertung	25

4.	Ergebnisse	27
4.1	Klinische Beobachtungen	27
4.1.1	Körpergewicht	27
4.1.2	Belastungsgrad	28
4.1.3	Verstorbene Tiere	29
4.2	Hirngewicht	30
4.3	Zelldichte	31
4.4	Apoptoserate	35
4.5	Von der Studie ausgeschossene Tiere	40
5.	Diskussion	41
5.1	Diskussion der Ergebnisse	41
5.1.1	Klinische Beobachtungen	41
5.1.2	Apoptoserate bei den Kontrolltieren	42
5.1.3	Apoptoserate bei den Versuchstieren	43
5.1.3.1	Apoptoserate nach therapeutischer PB-Dosis	43
5.1.3.2	Apoptoseinduktion durch supratherapeutische PB-Dosis	45
5.2	Diskussion der Methoden	48
6.	Schlussfolgerungen	51
7.	Literaturverzeichnis	53
8.	Anhang	57
8.1	TUNEL-Färbung	57
8.2	Caspase-3-Aktivität	57
9.	Ehrenwörtliche Erklärung	59

0. Zusammenfassung

Phenobarbital ist das Medikament der Wahl bei der Behandlung von Krampfanfällen in der Neugeborenenperiode. Jedoch wurde diese Therapie durch eine Studie von Bittigau et al. (Bittigau et al. 2002) in Frage gestellt, in der eine Steigerung der Apoptoserate im Gehirn neugeborener Ratten nach einer Einmalgabe Phenobarbital (PB) am 7. Lebenstag (P7) bereits bei therapeutischen Dosierungen von 40 mg PB/kg KG (Körpergewicht) innerhalb von 24 Stunden beschrieben wird.

In dieser Arbeit soll die Apoptoserate nach PB-Applikation in einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen mittels Anfärbung von Hirnschnitten mit HE (Hämatoxylin-Eosin) unter dem Lichtmikroskop untersucht werden. Auf Grund der Ergebnisse von Bittigau et al. stellte sich die Frage, ob die beschriebene Apoptosesteigerung innerhalb von 24 Stunden nur eine Beschleunigung eines physiologischen Vorgangs darstellt oder ob dadurch zusätzliche Zellen untergehen und wie sich die Apoptoseraten im Gehirn im weiteren Verlauf entwickeln.

Neugeborenen Wistar-Ratten wurde an P7 50 oder 87,5 mg PB/kg KG bzw. NaCl als Kontrolllösung intraperitoneal injiziert. An den Tagen P8, P9, P10, P11, P14 und P21 erfolgte die Tötung von jeweils zehn Tieren pro Gruppe und anschließende Hirnentnahme. Bis zu ihrer Tötung wurden die Tiere täglich begutachtet und gewogen. Dabei zeigten die Tiere, die eine therapeutische PB-Dosis von 50 mg/kg KG erhalten hatten, nur wenige klinische Auffälligkeiten als Folge der Medikamenteninjektion. Dagegen fielen die Tiere, die eine supratherapeutische PB-Dosis appliziert bekommen hatten, an den Tagen nach der Injektion durch eine deutliche Sedierung und wesentlich geringere Gewichtszunahme im Vergleich zu den Kontrolltieren auf.

Die Untersuchungen zur Apoptose im Gehirn erfolgte durch drei verschiedene Methoden: In der rechten Hemisphäre wurde die Caspase-3-Aktivität als indirekter Nachweis von Apoptose gemessen. Aus Material der linken Hemisphäre wurden histologische Schnitte angefertigte, die mit HE oder TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) gefärbt wurden. Mit diesen beiden Färbemethoden ist es möglich, apoptotische Zellen bzw. DNA-Doppelstrangbrüche unter dem Lichtmikroskop darzustellen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der HE-Färbung zeigte sich bei den Kontrolltieren ein physiologischer Verlauf der Apoptoserate mit einem Maximum an apoptotischen Zellen an P8 und einem darauffolgenden Abfall bis zum letzten untersuchten Tag der Studie an P21.

Bei der Versuchsgruppe, die mit 50 mg PB/kg KG behandelt worden war, zeigten sich so gut wie keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl apoptotischer Zellen im Gehirn im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gehirn der Tiere, die 87,5 mg PB/kg KG erhalten hatten, ließen sich an den Tagen P10 und P11 in verschiedenen Hirnregionen signifikant vermehrte apoptotische Zellen nachweisen im Vergleich zu den Kontrolltieren. In den beiden anderen Nachweismethoden war zudem an den Tagen P8, P9 und P21 zum Teil ein vermehrter apoptotischer Zelltod zu sehen. Ebenso wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Studie Unterschiede in der Zellzahl im Gehirn zwischen den beiden Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe festgestellt, die fast immer mit gleichzeitig erhöhten Apoptoseraten in der jeweiligen Hirnregion in wenigsten einer Nachweismethode für Apoptose korrelierten. Jedoch traten die signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe unregelmäßig sowohl hinsichtlich der betroffenen Hirnregionen als auch im zeitlichen Verlauf auf. Nichts desto trotz waren diese Unterschiede aber nach einer supra-therapeutischen PB-Dosis nachweisbar und nach einer therapeutischen PB-Dosis nicht.

Die Ergebnisse der Studie von Bittigau et al., dass bereits therapeutische Dosen von PB zu gesteigerten Apoptoseraten im Gehirn führen, lassen sich mit dieser Arbeit nicht bestätigen. Dies könnte ein Hinweis auf genetische Unterschiede in der Pharmakosensibilität oder der Transporter der Blut-Hirn-Schranke sein, so dass letztendlich bei gleicher PB-Dosierung niedrigere Medikamenten-Spiegel im Liquor erreicht werden.

Der vermehrte apoptotische Zelluntergang im Gehirn nach einer supra-therapeutischen PB-Dosis könnte eine direkt Folge des Antiepileptikums sein. Denkbar wäre aber auch, dass er eine Folge der unerwünschten Arzneimittelwirkungen ist, insbesondere der temporären Unterernährung, die durch die Sedierung und damit Trinkschwäche zustande kam. Dieser Einflussfaktor der Ernährung auf den apoptotischen Zelluntergang ließe sich beim Menschen durch eine suffiziente intensivmedizinische Betreuung weitgehend ausschalten. Für die Therapie beim Menschen können auf der Grundlage dieser Arbeit keine konkreten Empfehlungen ausgesprochen werden. Da die Versuchsdaten offensichtlich nicht ohne weiteres von einem Rattenstamm auf den anderen übertragbar sind, ist somit fraglich, inwieweit Schlussfolgerungen auf den Menschen überhaupt möglich sind. Zudem bleibt auf jeden Fall auch noch abzuwarten, was weitere Studien zu beispielsweise genetischen Einflüssen auf die Pharmakosensibilität oder längerer Anwendung von PB ergeben.

1. Einleitung

1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund dieser Arbeit

Phenobarbital (PB) ist nach den aktuellen Leitlinien das Medikament der Wahl bei der Behandlung von zerebralen Anfällen bei Früh- und Neugeborenen und war lange Zeit Standard in der Prophylaxe von Fieberkrämpfen (Morselli 1993). Obwohl PB eine große therapeutische Breite besitzt, sind einige unerwünschte Arzneimittelwirkungen beschrieben. Darunter finden sich eine stark sedierende Wirkung und Veränderungen von Verhalten, Affekt und Wahrnehmung (Cramer und Mattson 1995). Des Weiteren sind Einflüsse auf die Hirnentwicklung beschrieben: Dessens et al. (Dessens et al. 2000) fanden heraus, dass der Kopfumfang nach pränataler PB-Exposition bei Kindern signifikant kleiner ist im Vergleich zur Kontrollgruppe und Farwell et al. (Farwell et al. 1990) berichten über einen niedrigeren IQ bei Kindern mit einer postnatalen PB-Langzeitbehandlung. Ähnliches beschreiben Sulzbacher et al. (Sulzbacher et al. 1999). Sie berichten über einen signifikant niedrigeren IQ nach Beendigung einer zweijährigen PB-Therapie als Prophylaxe von Krampfanfällen im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei sich dieser Effekt auf den IQ aber bereits nach sechs Monaten auf einen nicht mehr signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe verringert hatte.

Bittigau et al. haben den Aspekt der Neurotoxizität genauer untersucht. Die Arbeitsgruppe führte eine Studie zum proapoptotischen Effekt verschiedener antiepileptischer Medikamente am unreifen Rattengehirn durch. Untersucht wurden Phenytoin, Phenobarbital, Diazepam, Clonazepam, Vigabatrin und Valproat. An dieser Stelle werden die Ergebnisse erläutert, die unter PB beobachtet wurden, da in der folgenden Arbeit nur Versuche mit diesem Antiepileptikum durchgeführt wurden.

Der Versuch wurde von Bittigau et al. an sieben Tage alten Wistar-Ratten durchgeführt, denen PB in den Konzentrationen 20, 30, 40, 50, 75 und 100 mg/kg KG intraperitoneal injiziert wurde. Nach 24 Stunden, also an P8, wurden die Tiere getötet. Zum Nachweis von apoptotischen Zellen wurden verschiedene histologische und molekulargenetische Methoden verwendet, darunter Färbungen von Hirnschnitten mit Silber- und Kupfernitrat und die Analyse von Hirngewebe mittels PCR und Western-Blot.

Bittigau et al. kamen zu dem Ergebnis, dass ab einer Dosis von 40 mg PB/kg KG die kumulative Apoptoserate im Vorderhirn signifikant erhöht war im Vergleich zur

Kontrollgruppe. Eine Dosierung von 75 mg PB/kg KG führte zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate in allen einzelnen untersuchten Abschnitten des Gehirns (Hippocampus, Gyrus dentatus, Thalamus, Frontalcortex, Parietalcortex, Cingulum und retrosplenialer Cortex). Weiterhin hatte eine Behandlung mit 70 mg PB/kg KG eine Abnahme des Hemisphärgewichts um 8 % im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Folge. Die apoptotische Neurodegeneration wurde durch PB-Plasmakonzentrationen von 25 und 35 µg/ml Serum über 12 Stunden gesteigert. Diese Plasmakonzentrationen werden auch beim Menschen bei der Behandlung von Krampfanfällen erreicht (Bittigau et al. 2002).

1.2 Phenobarbital

Phenobarbital ist eine 5-Ethyl-5-Phenylbarbitursäure (siehe Abbildung 1) mit einem pK_a -Wert von 7,3, was annähernd dem physiologischen pH-Wert des Blutplasmas von 7,4 entspricht. Sie ist sowohl in Wasser als auch in Fett schlecht löslich, löst sich aber relativ gut in organischen Lösungsmitteln wie zum Beispiel Ethanol. Für die intravenöse oder intramuskuläre Injektion wird das Natrium-Salz des Barbiturats verwendet, das sich frei in Wasser löst (Anderson und Levy 1995). Phenobarbital verteilt sich nach der Aufnahme (oral, intramuskulär, intravenös oder – wie in dem

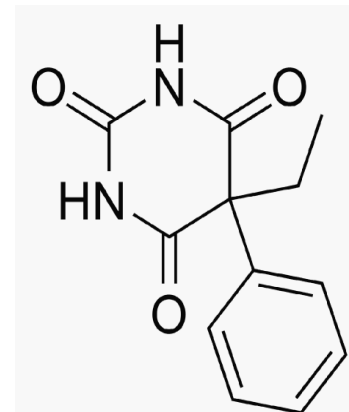


Abbildung 1
Strukturformel von Phenobarbital

unten beschriebenen Versuch – intraperitoneal) in allen Körpergeweben, wobei zu beachten ist, dass sich das Medikament zuerst in den gut durchbluteten Organen wie etwa Herz, Leber, Niere oder Gehirn anreichert. In Fettgewebe dagegen reichert sich Phenobarbital aufgrund der schlechten Fettlöslichkeit kaum an.

Dosierungen für Neugeborene betragen 5 mg/kg KG/Tag zur Anfallsprophylaxe und 10-30 mg/kg KG zur Anfallsunterbrechung. Therapeutische Serumspiegel bei Neugeborenen liegen bei 12-20 µg/ml Blut, die Phenobarbitalkonzentration im Gehirn von Kindern beträgt dabei zwischen 48 % und 83 % der Plasmakonzentration (Dodson und Rust 1995, Schwabe et al. 2001). Die Plasmahalbwertszeit ist stark abhängig vom Alter. Sie ist bei Neugeborenen am längsten und liegt hier zwischen 130 und 500 Stunden (Morselli 1993). Diese große Bandbreite der Halbwertszeit lässt sich durch die noch nicht

vollständig ausgereifte glomeruläre Filtration der Niere und die noch mangelhafte Leberfunktion erklären, wobei diese in den ersten Lebenswochen aber stetig zunehmen (Bartmann und Roos 2002).

Die Wirkung des Barbiturats erfolgt auf Rezeptorebene an verschiedenen Stellen. Zum einen werden postsynaptische inhibitorische GABA_A (γ -amino butyric acid)-Rezeptoren aktiviert, wodurch es zu einer erhöhten Chloridleitfähigkeit der Neurone kommt. Die Folge ist eine Hyperpolarisation der Nervenzelle und damit eine verminderte Erregbarkeit (Prichard und Ransom 1995, Feuerstein 2005). Ein zweiter Effekt von Phenobarbital ist die Hemmung exzitatorischer Glutamat-Rezeptoren. Durch diese beiden Mechanismen kommt es zu einer funktionellen Hemmung der *Formatio reticularis* und damit zu einer antikonvulsiven Wirkung.

Die Ausscheidung von Phenobarbital erfolgt über die Niere, wobei es zum Teil davor in der Leber hydroxyliert und glukuronidiert wird und zum anderen Teil unverändert renal eliminiert wird. Die Elimination verläuft nach einer Kinetik nullter Ordnung und ist somit unabhängig von der Plasmakonzentration (Dodson und Rust 1995).

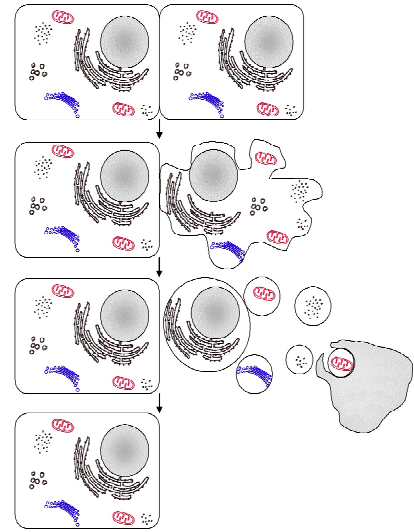
Unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind etliche bekannt, insbesondere bei Neugeborenen. Neben den bereits erwähnten kann es weiterhin zu Somnolenz, insbesondere bei Kindern aber auch zu Übererregbarkeit, kommen (Painter und Gaus 1993, Verspohl 2001). Bei Langzeit-Anwendung ist bei Kindern eine mangelnde Knochenmineralisierung (*Rachitis antiepileptica*) als Folge der Therapie möglich, in Einzelfällen auch eine megaloblastäre Anämie (Cramer und Mattson 1995, Verspohl 2001).

Trotz allem ist Phenobarbital neben Benzodiazepinen das Mittel der Wahl zur Unterbrechung eines Status epilepticus und bei der Behandlung von Fieberkrämpfen in der Neugeborenenperiode, weil es eine gute Wirksamkeit bei relativ großer therapeutischer Breite von 10-40 μg PB/ml Serum besitzt (Schwabe et al. 2001, Verspohl 2001, Painter und Gaus 1995). Allerdings traten nach der Studie von Bittigau et al. (Bittigau et al. 2002), die im Tiermodell eine Steigerung der natürlichen Apoptoserate nach PB-Behandlung in der Neugeborenenperiode zeigte, Zweifel an der Sicherheit dieser Standardtherapie von Neugeborenenkrämpfen auf.

1.3 Apoptose

Der berichtete negative Einfluss von Phenobarbital auf das neuronale Wachstum durch eine Steigerung der Apoptoserate wurde bereits erwähnt. Apoptose oder programmierter Zelltod (abgeleitet vom griechischen Wort *apoptosis*, was soviel bedeutet wie das Fallen der Blätter im Herbst) bezeichnet

Abbildung 2
Schematische Darstellung der Apoptose: Zellschrumpfung gefolgt von Ausstülpung der Zytoplasmamembran und Bildung von Vesikeln. Diese sog. *apoptotic bodies* werden von Makrophagen ohne lokale Entzündungsreaktion aufgenommen. (Aus: Hoffmeister 2005)



einen physiologischen Vorgang, bei dem meist nur einzelne Zellen in einem ansonsten gesunden Gewebe oder Organ ihren eigenen Tod einleiten (Löffler und Petrides 2003) oder ihr Tod von Nachbarzellen induziert wird (Horn und Krüger 2003). Dabei verliert die Zelle ihren Kontakt zu den Nachbarzellen, sie schrumpft und es kommt zur Kondensation von Zellkern und Zytoplasma. Währenddessen bleiben die Zellorganellen zunächst noch funktionsfähig. Anschließend kommt es zur Fragmentation der DNA (desoxy ribonuclein acid) und zu Ausstülpungen der Zytoplasmamembran (sog. *membrane blebbing*). Die so entstandenen Vesikel - oder auch *apoptotic bodies* - können nun von Phagozyten aufgenommen und ohne lokale Entzündungsreaktion entfernt werden (Oppenheim 1991) (siehe Abbildung 2). Der gesamte Prozess der Apoptose benötigt im Gewebe nur wenige Stunden.

Der Vorgang der Apoptose muss klar unterschieden werden von dem Vorgang der Nekrose. Diese ist ein pathologischer Vorgang und betrifft meist mehrere Zellen eines Gewebes, die exogen geschädigt wurden, so dass ein programmierter Zelltod nicht mehr möglich ist (Horn und Krüger 2003). Es kommt zur Zellschwellung und zum Verlust der Membranfunktion gefolgt von Ruptur und Austritt von Zellinhalten (Oppenheim 1991). Meistens wird die Nekrose von einer entzündlichen und immunologischen Reaktion begleitet.

Apoptose tritt in erster Linie unter natürlichen Bedingungen auf, unter anderem während der neuronalen Entwicklung und Reifung (Oppenheim 1991). Sie spielt hier eine große Rolle bei der Neurogenese, Migration von Nervenzellen, Ausbildung von Axonen und

Differenzierung von Dendriten, aber auch bei der Fehlerkorrektur (Gould et al. 1991, Burek und Oppenheim 1996). Dabei folgt der Anstieg bzw. Abfall der Apoptoseraten einem charakteristischen zeitlichen und räumlichen Muster (Ferrer et al. 1990b, Ferrer et al. 1990a). So erreicht beispielsweise im Gehirn der Ratte der Hippocampus sein Apoptosemaximum an P5, der cerebrale Cortex erst an P7 (Ferrer et al. 1994). Die Auslösemechanismen sind hierbei noch nicht genau geklärt. Wahrscheinlich begehen unter anderem diejenigen Zellen Selbstmord, die keine Verbindung zu Nachbarzellen ausbilden können, aber auch synaptische Zielzellen, afferente Verbindungen und neurotrophische Faktoren wie etwa der Nervenwachstumsfaktor (NGF) spielen vermutlich eine Rolle (Oppenheim 1991). Weiterhin gibt es Anhaltspunkte dafür, dass auch niedrige Glukokortikoidspiegel einen positiven, das heißt steigenden, Einfluss auf die Apoptose haben (Gould et al. 1991).

Die Apoptose einer Zelle kann jedoch auch Folge von Zellstress oder toxischen Substanzen sein und wird hierbei über Signalkaskaden ausgelöst. Eine wichtige Rolle spielen hierbei fast immer die Caspasen (siehe Abbildung 3). Caspasen sind Cystein-Proteasen, die Aminosäureketten hinter der Aminosäure Aspartat schneiden. Sie werden eingeteilt in zwei große Gruppen, die sich hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und ihrer Funktion unterscheiden: Die Adaptercaspasen und die Effektorcaspasen. Die Adaptercaspasen (Caspasen 2, 8, 9 und 10) dienen der Aktivierung der Caspase-Kaskade, indem sie das Apoptose-auslösende Signal an die Effektorcaspasen vermitteln. Die Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 7) sind verantwortlich für die eigentliche Zerstörung der Zelle (Creagh et al. 2003). Um die Adaptercaspasen zu aktivieren gibt es zwei verschiedene Signalwege, die im Nervensystem eine Rolle spielen: Den mitochondrialen Weg und den Todesrezeptorweg.

Der mitochondriale Weg wird durch Zellstress, wie zum Beispiel zytotoxische Medikamente, ionisierende Strahlung oder Hypoxie (Creagh et al. 2003, Daval et al. 2004, Olney et al. 2002) ausgelöst. Er führt zu einer Freisetzung von Cytochrom c (Bestandteil der Atmungskette an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran) aus den Mitochondrien ins Zytosol, wo es zur Aktivierung der Caspase 9 führt, die wiederum Caspase 3 und 7 aktiviert. Hierbei spielt das anti-apoptotisch wirkende Protein Bcl-2 eine entscheidende Rolle. Es stabilisiert normalerweise die äußere Mitochondrienmembran und verhindert so ein Austreten des Cytochrom c ins Zytosol (Mooney und Miller 2000). Ein weiteres wichtiges Protein aus der Bcl-Familie ist das Bax-Protein, das eine pro-

apoptotische Wirkung an den Mitochondrien hat. Beim Erwachsenen ist es in der Regel kaum vorhanden, jedoch ist es während der prä- und postnatalen Periode im Gehirn nachweisbar und hat großen Einfluss auf die Entwicklung des Nervensystems (Mooney und Miller 2000).

Auch der Todesrezeptorweg endet in der Aktivierung der Caspase 3 und spielt eine wichtige Rolle für die normale Funktion von Geweben und Organen. Er kann durch verschiedene Botenstoffe, wie etwa den Fas-Liganden auf zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen, TNF- α (Tumornekrosefaktor α) oder Glukokortikoide, in Gang gesetzt werden. Der Todesrezeptor gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren und besitzt auf der Zytoplasmaseite eine sogenannte Todesdomäne. Bindet nun auf der extrazellulären Seite einer der Botenstoffe an den Rezeptor, ist die Todesdomäne in der Lage, die Caspase 8 zu aktivieren. Die Caspase 8 aktiviert je nach Zelltyp entweder direkt die Caspase 3 oder führt indirekt zu ihrer Aktivierung, indem sie Cytochrom c aus den Mitochondrien freisetzt. Die aktivierte Caspase 3 aktiviert ihrerseits eine im Zytoplasma an einen Inhibitor gebundene Desoxyribonuklease (DNase), indem sie den Inhibitor abbaut. Dadurch wird eine nukleäre Lokalisierungssequenz freigelegt und die CAD (Caspase-aktivierte DNase) kann in den Zellkern vordringen, wo sie die DNA in Fragmente zerlegt. Die Elimination der apoptotischen Zellen erfolgt schlussendlich durch Phagozytose, wobei es typischerweise zu keiner Entzündungsreaktion in der Umgebung kommt (Creagh et al. 2003, Oppenheim 1991).

Bei Untersuchungen zur Apoptose am Rattengehirn sind neben Kenntnissen über die normale Hirnentwicklung auch Kenntnisse über die physiologischen Apoptoseraten der einzelnen Hirnabschnitte von Bedeutung sowie die Entwicklung der Apoptoserate mit dem Zeitverlauf. Im Cortex hat die Apoptoserate ihr Maximum an P7 mit etwa 3 apoptotischen Zellen pro 1000 gesunden Zellen. Nach P7 folgt ein Abfall der Apoptose. Im Gyrus dentatus liegt das Maximum an P6 mit durchschnittlich 5-7 apoptotischen Zellen pro 1000 gesunden Zellen und im Hippocampus bereits an P0 und P1 mit bis zu über 70 Apoptosen pro 1000 Zellen (Ferrer et al. 1994, Ferrer et al. 1990a, Ferrer et al. 1990b, Gould et al. 1991). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Apoptoserate nach einem postnatalen Anstieg auf unterschiedliche Spitzenwerte je nach Hirnregion spätestens ab P8 wieder abfällt, bis sie beim erwachsenen Tier kaum noch nachweisbar ist.

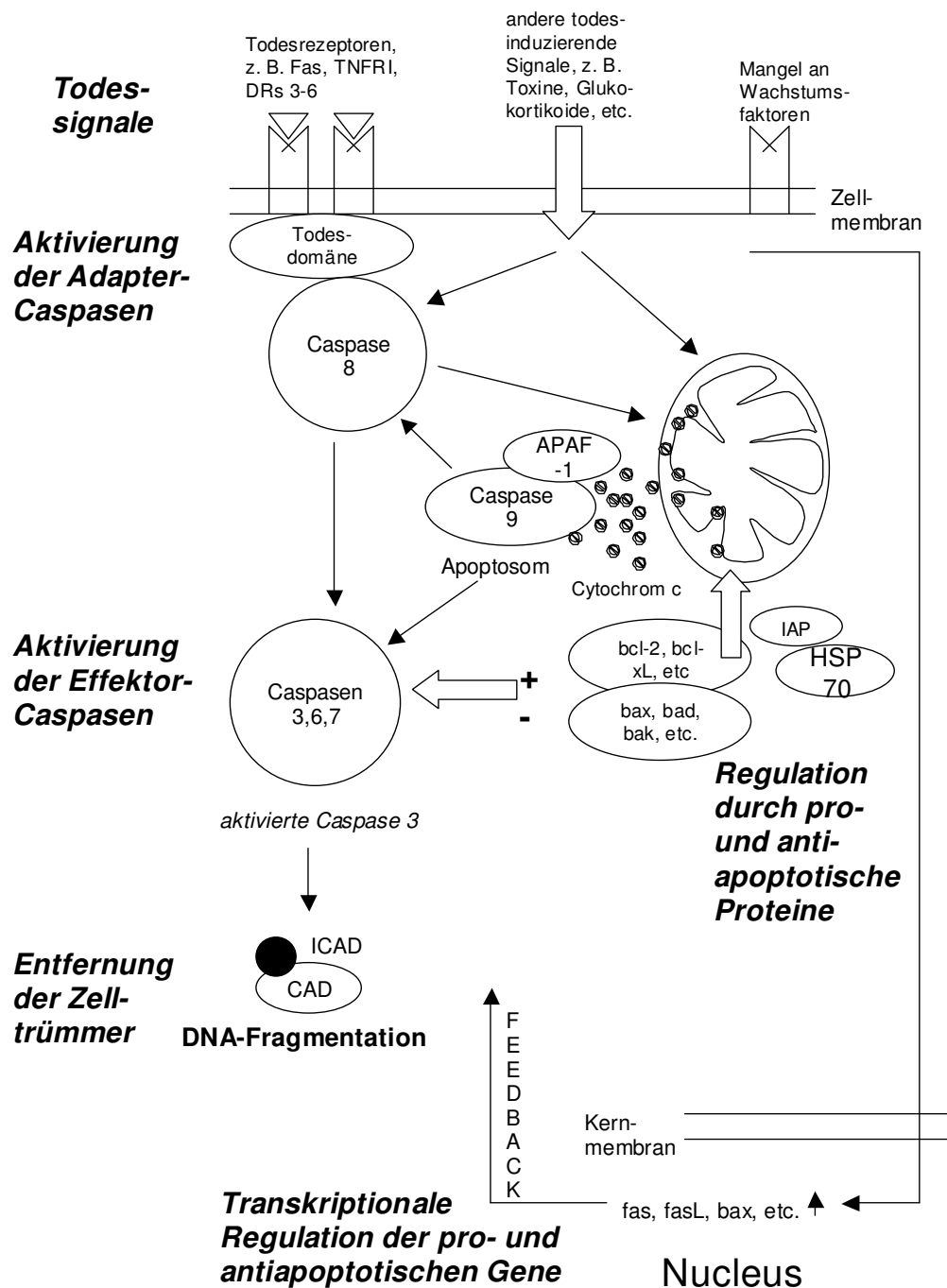


Abbildung 3

Aktivierungskaskade der Apoptose. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Aktivierungskaskade in Gang zu setzen. Ein Weg erfolgt über die Aktivierung des Todesrezeptors durch verschiedene Transmitter, was zur Aktivierung der Caspase 8 führt. Der zweite Weg beginnt mit der Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien als Folge von Zellstress. Beide Wege enden letztendlich in der Aktivierung der Caspase 3, die die Apoptose der Zelle in Gang setzt. (IAP – inhibitor of apoptosis protein, ICAD – inhibitor of Caspase-activated DNase, DRs – death receptors, HSP 70 – heat shock protein 70) (Nach: Stadelmann und Lassmann 2000)

2. Ziele der Arbeit

In der Einleitung wurde bereits ausführlich über die apoptotische Neurodegeneration innerhalb von 24 Stunden nach einer einmaligen PB-Applikation berichtet, die von Bittigau et al. beschrieben wurden. Der Nachteil der Arbeit von Bittigau et al. ist allerdings, dass die Beobachtung der Tiere nur über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt wurde. Daraus ergibt sich die Frage, wie sich die apoptotische Neurodegeneration nach den ersten 24 Stunden nach PB-Applikation weiter entwickelt. In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob die natürliche neuronale Apoptose lediglich beschleunigt abläuft und die Apoptoserate früher als unter natürlichen Bedingungen auf ihr physiologisches Maß abfällt oder ob durch die Wirkung des PB zusätzliche Zellen zugrunde gehen und über einen längeren Zeitraum eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nachweisbar ist. Zusätzlich zu den Untersuchungen zur Apoptoserate soll auch die Entwicklung der Zellzahlen im Gehirn und des Hirngewichts dargestellt werden. Zudem werden klinische Auffälligkeiten der Versuchstiere bis zu ihrer Tötung erfasst und im Zusammenhang mit ihrer Medikation ausgewertet.

Die Aufgabe dieser Arbeit liegt darin, Apoptoseraten im unreifen Rattengehirn nach einer einmaligen PB-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe mittels HE-Färbung zu bestimmen und auszuwerten. Zusätzlich wurden Daten verwendet, die sich aus der Auswertung der TUNEL-Färbung der Hirnschnitte ergaben und von Frau cand. med. K. Lang bearbeitet wurden. Außerdem stellte Herr Dr. H. S. Fink aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie der Friedrich Schiller-Universität seine Daten aus der Messung der Caspase-3-Aktivität im Rattengehirn zur Verfügung. Die Nutzungsgenehmigung zur Verwendung der Daten in dieser Arbeit liegt vor.

Ziel der Arbeit ist es, eine Aussage darüber zu treffen zu können, welche Folgen eine Einmalgabe von PB bei neugeborenen Ratten für die Hirnentwicklung innerhalb der nachfolgenden 14 Tage nach PB-Injektion hat und welche Kompensationsmechanismen unter Umständen zum Tragen kommen.

3. Methodik

3.1 Das Tiermodell

Ratten eignen sich sehr gut für Studien über die Hirnentwicklung bzw. Einflüsse auf die neuronale Reifung, da ihr Gehirn bei Geburt noch vollständig ungyriert ist. Das heißt also, dass die gesamte Hirnreifung postnatal abläuft und somit für Interventionen im Rahmen von Studien relativ leicht zugänglich ist (Kaufmann 2000). Dazu kommt, dass bei allen Säugern die Hirnentwicklung im Großen und Ganzen nach dem gleichen Muster abläuft, wodurch Rückschlüsse vom Tier auf den Menschen möglich sind.

Wichtig für Untersuchungen auf Neurotoxizität bestimmter Medikamente sind Kenntnisse über vulnerable Phasen der verschiedenen Hirnabschnitte bzw. der zeitliche Ablauf der neuronalen Entwicklung. In der unmittelbaren postnatalen Periode (P0-P21) sind insbesondere folgende Entwicklungsvorgänge von Bedeutung: der sogenannten *brain growth spurt*, die Proliferation der Gliazellen, die kontrollierte Neuro- und Gliogenese, die kontrollierte Migration und Ansiedlung von Nervenzellen, die Vaskularisierung und Ausbildung der Bluthirnschranke, allgemeine Differenzierungsprozesse und die Entwicklung der Neurotransmittersysteme (Kaufmann 2000). All diese Prozesse stellen mögliche Angriffspunkte für Störungen der normalen Hirnentwicklung dar. Die brain growth spurt-Phase beim Menschen erstreckt sich vom Feten im letzten Trimenon der Schwangerschaft bis zu einigen Jahren nach der Geburt (Bittigau et al. 2002, Kaufmann 2000).

Für die Untersuchungen zur Steigerung der Apoptoserate am unreifen Gehirn nach PB-Gabe wurde aus mehreren Gründen ein Rattenmodell gewählt. Zum einen basiert diese Arbeit auf der Studie von Bittigau et al. (Bittigau et al. 2002), in der Wistar-Ratten verwendet wurden. Um Vergleiche zwischen beiden Studien anstellen zu können, wurden auch in dieser Studie Wistar-Ratten als Versuchstiere eingesetzt. Zum anderen eignen sich Ratten aus den oben bereits genannten Gründen sehr gut für Studien am Nervensystem und da die Untersuchungen zur Neurotoxizität von PB bei Neugeborenen am Tiermodell noch nicht abgeschlossen sind – es fehlen wie gesagt noch Daten zur langfristigen Beobachtung der Apoptoserate nach PB-Gabe – verbieten sich in diesem Stadium Versuche am Menschen von selbst.

3.2 Allgemeiner Versuchsablauf

Neugeborenen Wistar-Ratten wurde am siebten Lebenstag (P7) Phenobarbital bzw. die Trägerlösung ohne Wirkstoff intraperitoneal injiziert. Es wurden Dosierungen von 50 und 87,5 mg PB/kg KG verwendet. Am 8., 9., 10., 11., 14. und 21. Lebenstag erfolgte die Tötung durch Dekapitation von jeweils zehn Tieren und anschließend deren Hirnentnahme. Aus Material der rechten Hemisphäre erfolgte die fluorometrische Messung der Caspase-3-Aktivität, aus der linken Hemisphäre wurden Schnitte angefertigt, die lichtmikroskopisch ausgewertet wurden. Dabei wurden jeweils in einer HE-Färbung und einer TUNEL-Färbung die apoptotischen Zellen gezählt und daraus die Apoptoserate errechnet.

3.3 Tierhaltung und Injektion

3.3.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 7 Tage alte Wistar-Ratten aus der Zucht des Forschungszentrum Lobeda der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Insgesamt wurde die Studie an 288 Tieren durchgeführt. Für die Versuchs- und Kontrolltiere wurden jeweils Geschwister verwendet, um genetische Unterschiede innerhalb einer Gruppe so gering wie möglich zu halten.

Die Tierversuche wurden von der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena befürwortet und durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz mit Bescheid vom 25. November 2004 und einem Änderungsbescheid vom 23. September 2005 genehmigt (Reg.-Nr. 02-25/04).

3.3.2 Tierhaltung

Schwangere Wistar-Ratten wurden unter automatisch kontrollierter Temperatur (20-24 °C) und Luftfeuchtigkeit (60 ± 12 %) und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden (6-18 Uhr) in Einzelkäfigen (Typ IV-Standardkäfig, Ehret, Emmendingen), die mit Streu

(Animal Bedding Granular, altromin, Lage) ausgelegt waren, gehalten. Sie erhielten Standard-Futter (1316 Zuchtfutter für Ratten und Mäuse, altromin) und Wasser *ad libitum*. Nach ihrer Geburt blieben die neugeborenen Ratten bei dem Muttertier im Käfig und wurden am sechsten Lebenstag vormittags zum ersten Mal herausgenommen, gewogen (Sartorius-Waage LC2201S, Sartorius, Göttingen) und am Schwanz zur eindeutigen Unterscheidung farbig markiert (Edding 400 permanent Marker, Edding, Ahrensburg). Die Tiere aus jedem Wurf wurden zwei Gruppen so zugeteilt, dass die Verteilung an Geschlechtern und Gewicht der Tiere in beiden Gruppen möglichst ähnlich war. Im Anschluss erfolgte zufällig die Zuordnung zu der Kontroll- bzw. der Versuchsgruppe. Durch die Teilung eines jeden Wurfs in Versuchs- und entsprechende Kontrollgruppe wurden mögliche Auswirkungen genetischer Unterschiede in der Verstoffwechslung des PB zwischen den beiden Gruppen möglichst gering gehalten, da es sich um Geschwistertiere handelte.

Am siebten Lebenstag wurden die Tiere erneut gewogen und bekamen anschließend je nach Gruppe entweder die PB- oder die Kontrolllösung appliziert (siehe Kapitel 3.3.4). Die PB-Lösung wurde in den Dosierungen 50 mg PB/kg KG oder 87,5 mg PB/kg KG injiziert (siehe Kapitel 3.3.3).

Bis zu ihrer Opferrung wurden die Tiere einmal täglich gewogen, gegebenenfalls neu markiert und nach einer Belastungstabelle in Anlehnung an die „Beurteilungskriterien für einen vorzeitigen Abbruch des Versuches zur Vermeidung unnötiger, erheblicher Belastungen beim Versuchstier“ des Tierschutzbeauftragten der Universität Würzburg begutachtet. Diese Kriterien waren modifiziert nach den „Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment“ (Morton und Griffiths 1985). Ausschlaggebend für die Beurteilung der Tiere waren folgende Punkte: Gewichtsreduktion, Temperaturabweichung von der physiologischen Körpertemperatur, Atmung, Herzfrequenz, Fellzustand, Spontanverhalten und Motorik. Falls im Belastungsscore eine zuvor definierte Punktzahl überschritten wurde, wurde der Versuch für das jeweilige Tier abgebrochen, um unnötige Belastungen zu vermeiden.

3.3.3 Dosierung des Phenobarbital

In einem ersten Versuchsdurchlauf wurde als Dosierung 50 mg PB/kg KG gewählt. Diese Dosierung hatte in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie von Bittigau et al. (Bittigau et al. 2002) bereits zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate der Gehirnzellen innerhalb von 24 Stunden nach einer Einmalgabe von PB an P7 geführt. Es wurde zunächst keine höhere Dosis verabreicht, um unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie starke Sedierung und die damit verbundenen Folgen wie Trinkschwäche und Gewichtsverlust zu vermeiden. Da sich in der Auswertung der Versuche mit 50 mg PB/kg KG jedoch keine signifikanten Unterschiede der apoptotischen Nervenzelldegeneration zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe abzeichneten, wurden bei einigen Tieren die PB-Serumspiegel ermittelt, um die Ursache dafür herauszufinden. Es zeigten sich bei gleicher Dosierung von PB keine Unterschiede in den Serumspiegeln zu der Arbeit von Bittigau et al., so dass das geringere Ansprechen der Tiere dieser Studie auf PB möglicherweise in genetischen Unterschieden liegt, die eine verminderten Sensibilität für das Medikament zur Folge haben könnten. Die Konsequenz war, dass trotz der gemessenen PB-Serumspiegel im therapeutischen Bereich eine zweite Versuchsreihe durchgeführt wurde mit einer supratherapeutischen Dosierung von 87,5 mg PB/kg KG, um herauszufinden, ob bei diesen noch verträglichen Serumspiegeln eine signifikante Steigerung der Apoptoserate zu beobachten ist.

3.3.4 Injektion der Kontroll- bzw. Phenobarbitallösung

3.3.4.1 Kontrolllösung

- Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %, Fresenius Kabi, Bad Homburg
- Ethanol 96 %, unvergällt, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Zu 50 ml NaCl 0,9 % in der Durchstechflasche wurden 0,06 ml Ethanol mit einer 1 ml-Spritze hinzugefügt, um den Alkoholgehalt der PB-Lösung anzugleichen.

3.3.4.2 Phenobarbitallösung

- NaCl 0,9 %, Fresenius Kabi
- Aqua ad iniectabilia, B.Braun, Melsungen
- Luminal, Desitin, Hamburg

Die Phenobarbital-Standardlösung hatte folgende Zusammensetzung: 34,4 ml NaCl 0,9 %, 4,6 ml Aqua ad iniectabilia, 1,0 ml Luminal (= 200 mg Phenobarbital). Ein Milliliter Lösung enthielt dem entsprechend 5 mg Phenobarbital. Der Natriumgehalt entsprach der Kontrolllösung.

3.3.4.3 Durchführung der Injektion

Vor der Injektion wurde den Tieren die Bauchdecke desinfiziert (SoftaseptN, B.Braun). Sie wurden an den Vorder- und Hinterfüßen fixiert und in Rückenlage in leichter Kopftieflage gehalten, so dass die jeweilige Lösung mit geringem Verletzungsrisiko nach Einstich im linken unteren Quadranten intraperitoneal injiziert werden konnte (Einmal-Injektions-Kanüle, Sterican, Größe 20, B.Braun). Als Dosierung für die Phenobarbitallösung wurden 50 und 87,5 mg PB/kg KG für die Versuchstiere gewählt. Diese Werte ergaben sich aus den oben erwähnten Bestimmungen der PB-Serumspiegel.

Nach der Injektion wurde die Einstichstelle für ca. drei Minuten mit dem Finger komprimiert, um ein Austreten des Injektats zu verhindern. Anschließend wurde der gesamte Wurf wieder zum Muttertier in den Käfig gesetzt.

3.4 Hirnentnahme

Am Tag der Opfierung wurden die Tiere ein letztes Mal gewogen. Vor der Tötung durch Dekapitation wurden die Tiere mit Diethylether (Diethylether, Fischar, Saarbrücken) betäubt. Dazu wurde ein steriler Tupfer mit Diethylether getränkt und in ein luftdicht verschließbares Gefäß gegeben. Die jungen Ratten wurden für ca. eine Minute in das Gefäß dazu gelegt und das Gefäß luftdicht verschlossen. Eine ausreichende Narkosetiefe

wurde dann durch eine ausbleibende Schmerzreaktion nach einem Nadelstich in die Pfote sichergestellt. Es erfolgte die Dekapitation mit einer chirurgischen Schere. Das Gehirn wurde freipräpariert, gewogen (430-33 Präzisionswaage, Kern, Balingen-Frommern) und die Hemisphären mittels Rasierklinge getrennt. Die linke Hälfte wurde zur Immersionsfixation in Formalin (Formaldehyd-Lösung 50 %, Fischer) gelegt. Aus ihr wurden Schnittpräparate zur lichtmikroskopischen Auswertung angefertigt. Die rechte Hemisphäre wurde durch Schnitte in der Fontalebene in die folgenden vier etwa gleich großen Teile geteilt: Frontalhirn (A), Stammganglien (B), Thalamus (C) und Kleinhirn (D). Diese wurden in vier Eppendorfhütchen (1,5 ml Biosphere Micro Tubes, Sarstedt, Nümbrecht), die zuvor leer gewogen worden waren, gelegt und bis zur Weiterverarbeitung zur Messung der Caspase-3-Aktivität auf Eis gelagert. Die Weiterverarbeitung erfolgte innerhalb von wenigen Minuten.

3.5 Nachweis von Apoptose

Apoptotische Zellen im Gehirn können auf verschiedene Arten nachgewiesen werden. Im Folgenden sollen besonders die Methoden dargestellt werden, die in der nachfolgenden Studie zur Anwendung kamen.

Eine Möglichkeit besteht im indirekten Nachweis der apoptotischen Zellen über die Messung der Caspase-3-Aktivität, dem zentralen Enzym in der Aktivierungskaskade. Von einer Erhöhung der Caspaseaktivität kann man dementsprechend auf eine gesteigerte Apoptoserate schließen. Der Vorteil dieser sehr spezifischen Methode ist, dass die Caspaseaktivität schon früh erhöht ist und sich somit Apoptose nachweisen lässt, bevor morphologische Merkmale wie etwa Kondensation des Zellkerns in Schnittbildern sichtbar werden (Stadelmann und Lassmann 2000).

Eine weitere Möglichkeit des Apoptose-Nachweises ist die Anfärbung von Gewebeschnitten mit

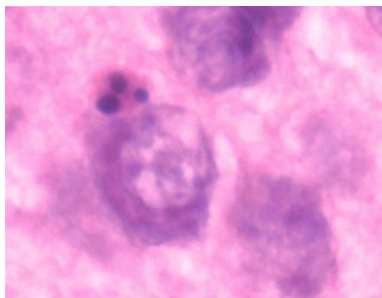


Abbildung 4

Hirnschnittpräparat des Parietalkortex einer zehn Tage alten Wistar-Ratte. HE-Färbung in 40facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop. Zu sehen ist eine typische apoptotische Zelle mit fraktioniertem Zellkern neben einer intakten Nervenzelle.

Gewebeschnitten mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung), wodurch sich Apoptose durch die typischen morphologischen Kriterien Kondensation des

Zellkerns und Bildung von *apoptotic bodies* nachweisen lässt (Stadelmann und Lassmann 2000) (siehe Abbildung 4).

Eine sinnvolle Ergänzung zur HE-Färbung ist die TUNEL (TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)-mediated dUTP (2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate)-biotin nick end labeling)-Methode. Hierbei macht man sich die DNA-Fragmentation während der Apoptose zu Nutze. Herkömmliche histologische Hirnschnitte werden zuerst mit einer Protease vorbehandelt und dann mit dUTP-Biotin versetzt, das an die DNA-Bruchenden bindet. Die Reaktion ist spezifisch für Doppelstrangbrüche, wie sie unter anderem während der apoptotischen Degeneration vorkommen, durch die charakteristische Bindung von TdT an das 3'-OH-Ende der DNA (Gavrieli et al. 1992). Die Auswertung dieser Färbemethode erfolgt unter dem Lichtmikroskop. Die TUNEL-Methode ist eine sehr sensitive Methode für den Nachweis von Doppelstrangbrüchen, ist aber nicht spezifisch für Apoptose sondern weist auch Doppelstrangbrüche anderer Ursache, z. B. durch Nekrose oder auch durch die Herstellung der Gewebeschnitte, nach.

Weitere Möglichkeiten zum morphologischen Apoptosenachweis sind eine Anfärbung der Gewebeschnitte mit Giemsa, die wie die HE-Färbung eine gute Differenzierung der nukleären Strukturen erlaubt, oder Acridin-Orange, das die Chromatin-Kondensation sichtbar macht (Geiger et al. 1997). Auch fluoreszierende Farbstoffe können verwendet werden. Hierbei ist vor allem eine Kombination aus SYTO-13 und Propidiumjodid zu nennen, wodurch eine Unterscheidung von Apoptose und Nekrose möglich wird. Weitere Alternativen sind die Elektronenmikroskopie, Gelelektrophorese oder der Apoptosenachweis mittels ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay), um nur einige zu nennen (Bonfoco et al. 1997).

3.5.1 HE-Färbung

3.5.1.1 Verwendete Materialien

3.5.1.1.1 Geräte und Zubehör

- Rasierklinge
- Siebartige Kunststoffkassetten

- Formen für die Einbettung der Gewebeschnitte
- Histokinette: Duplex Processor, Standon Eliott,
- Mikrotom (Edelstahlmesser Härtegrad C), Leitz Wetzlar (jetzt Leica Microsystems), Wetzlar
- SuperFrost Plus Objektträger, Menzel-Gläser, Braunschweig
- Menzel-Deckgläser, Menzel-Gläser
- Brutschrank Kelvitron t, Haereus instruments, Düsseldorf

3.5.1.1.2 Reagenzien und Lösungen

- Formaldehyd-Lösung 50 %, Fischer
- Paraffingranulat (Schmelzpunkt bei 51-53 °C), Merck, Darmstadt
- Xylol, Sigma
- Alkohol (50%ig, 70%ig, 96%ig und absolut), Fluka
- Hematoxylin 5 Lösung nach Mayer, Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
- Accustain EosinYLösung, Alkoholisch, Sigma-Aldrich
- Roti-Histokitt, Roth, Karlsruhe
- Aqua dest.

3.5.1.2 Präparation

Nachdem die Gehirnhälften mindestens 24 Stunden in Formalin gelegen hatten wurden sie mit einer Rasierklinge in die gleichen vier Anteile, wie zur Caspase-3-Messung (Frontalhirn, Stammganglien, Thalamus und Kleinhirn) geteilt und in siebartige kleine Kunststoffkassetten gelegt. Unter fließendem handwarmem Wasser wurde für 3-4 Minuten das Formalin ausgewaschen und das Gehirngewebe anschließend in der Histokinette entwässert. Die Alkoholreihe war dabei in folgenden Konzentrationen angelegt: 70 % - 70 % - 96 % - 96 % - 96 % - absoluter Alkohol - Ethanol und Xylol im Verhältnis 2:1 - Ethanol und Xylol im Verhältnis 1:2. Als letzten Schritt in der Histokinette wurde das Hirngewebe in ca. 60 °C heißes Paraffin getaucht. Anschließend wurde es in ca. 60 °C heißem Paraffin in vorgefertigten Formen eingebettet und einige Stunden bei

Raumtemperatur zum Erstarren stehen gelassen. Mit dem Mikrotom wurde das eingebettete Gewebe in 6-7 μm dünne Scheiben geschnitten und in kaltes Aqua dest. gelegt. Die Schnitte wurden im Wasser auf Objektträger gezogen und dann in 56 °C warmes Aqua dest. gelegt, um das Gewebe auf dem Objektträger zu glätten. Über Nacht wurden die Objektträger bei 40 °C in einen Brutschrank gelegt. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe: zweimal je fünf Minuten in Xylol, fünf Minuten in absolutem Alkohol, zweimal fünf Minuten in 96%igem Alkohol und je fünf Minuten in 70%igem und 50%igem Alkohol. Anschließend wurden die Präparate mit Aqua dest. abgespült.

Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Schnitte für ca. 20 Minuten in Haematoxylin getaucht und dann mit Aqua dest. abgespült. Zum Bläuen der Zellkerne wurden die Präparate anschließend für 5-10 Minuten in Leitungswasser gelegt. Es folgte die Anfärbung mit Eosin für 5-7 Minuten, welches anschließend ebenfalls mit Aqua dest. abgespült wurde. Die Hirnschnitte wurden erneut in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert: Je 1-2 Minuten in 50%igem, 70%igem, zweimal 96%igem Alkohol, absolutem Alkohol und zweimal in Xylol. Nach dem Abtropfen der Objektträger wurden die Präparate mit Roti-Histokitt abgedeckt und ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt. Zum Trocknen wurden die Präparate noch einen Tag stehen gelassen, bevor sie für die Auswertung am Mikroskop (siehe Kapitel 3.6) bereit standen.

3.6 Auswertung der Hirnschnitte

Für die mikroskopische Auswertung der Hirnschnitte wurde ein herkömmliches Lichtmikroskop (BX61, Olympus, Hamburg) verwendet. Alle Zählungen wurden bei 40facher Vergrößerung durchgeführt. Folgende Regionen wurden ausgewertet: Frontalcortex (FC), Striatum (Str), Parietalcortex (Par), Thalamus (Thal), Gyrus dentatus (DG), Hippocampus Regionen 1-4 (HC1-4) und Cerebellum (CB). Die entsprechenden Hirnregionen wurden mit Hilfe eines Atlanten der Hirnentwicklung von Ratten (Paxinos und Watson 1998) zugeordnet. Die zu zählenden Ausschnitte wurden zufällig aus der jeweiligen Region ausgewählt.

3.6.1 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde eine Zählkammer verwendet, die aus 49 identischen Quadraten bestand. In ein Gesichtsfeld ließen sich rund 399 Quadrate der Zählkammer legen. Die Größe des Gesichtsfeldes betrug $0,24 \text{ mm}^2$.

In jedem eingestellten Gesichtsfeld wurden die Zellen in jeweils drei Quadraten der Zählkammer gezählt und anschließend die Zellzahl auf das Gesichtsfeld hochgerechnet. In den Regionen FC, Str, Par, Thal und CB wurde der Durchschnitt aus je drei Gesichtsfeldern gebildet, in den Regionen DG und HC1-4 aus Gründen der geringen Größe der Durchschnitt aus nur je zwei Gesichtsfeldern. Insgesamt wurden aus jeder Kontroll- und Versuchstiergruppe jeweils drei Tiere zufällig ausgewählt, aus deren gezählten Zelldichten wiederum die Durchschnittswerte der einzelnen Hirnregionen ermittelt wurden.

3.6.2 Bestimmung der Apoptoserate

In den Regionen FC, Str, Par, Thal und CB wurde jeweils der Mittelwert der apoptotischen Zellen aus sechs Gesichtsfelder gebildet, in DG und den vier Regionen HC1-4 des Hippocampus der Mittelwert aus nur zwei Gesichtsfeldern, da diese Regionen zu klein waren, um mehr Felder auszuzählen.

Als Kriterien für eine apoptotische Zelle wurden die lichtmikroskopisch sichtbaren Merkmale der Apoptose verwendet. Dazu gehören die Kondensation des Zellkerns und die Ausbildung der sogenannten *apoptotic bodies*.

3.7 Statistische Auswertung

Aus den jeweiligen Gruppen wurde aus der Anzahl der apoptotischen Zellen für jede Hirnregion der arithmetische Mittelwert (MV = mean value) und die Standardabweichung (STAB) errechnet. Die Abweichung der Mittelwerte wurde mit Hilfe des t-Testes auf die Signifikanz getestet, das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$. Die Korrelationen der

Ergebnisse aus den verschiedenen Nachweismethoden für Apoptose wurden mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten überprüft.

Bei dem verwendeten Statistikprogramm handelte es sich um SPSS Software, Version 13.0, Lead Technologies Inc., Chicago, IL, USA.

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Beobachtungen

4.1.1 Körpergewicht

Alle Tiere sowohl aus der Kontroll- als auch aus den Versuchsgruppen wurden ab ihrem sechsten Lebenstag bis zu ihrer Tötung an P8, P9, P10, P11, P14 oder P21 täglich einmal gewogen. Dabei zeigte sich bei den Tieren der Kontrollgruppe und den Tieren, die 50 mg PB/kg KG injiziert bekommen hatten, ein ähnlicher Gewichtsverlauf. Allerdings lag das Körpergewicht der Tiere, die eine therapeutische PB-Dosis erhalten hatten, an den Tagen P8 bis P10 unter dem der Kontrolltiere. Ab dem Tag P11 jedoch waren keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich des Körpergewichts nachweisbar. In der Zunahme des Körpergewichts pro Tag zeigten sich so gut wie keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen: Auf den Tag P8 nahmen die Versuchstiere noch deutlich weniger an Gewicht zu, als die Versuchstiere ($0,85 \pm 0,63$ g vs. $2,46 \pm 0,59$ g). Doch bereits auf den Tag P9 bis zum Tag P20 zeigten die Tiere aus beiden Gruppen einen ähnlichen Gewichtszuwachs von täglich $1,65 \pm 0,67$ g (Kontrollgruppe) bzw. $1,86 \pm 0,55$ g (50 mg PB/kg KG). Von P20 auf P21 stieg die Gewichtszunahme in beiden Gruppen sprunghaft auf durchschnittlich $4,69 \pm 2,41$ g bzw. $4,44 \pm 0,77$ g an.

Bei den Tieren, die 87,5 mg PB/kg KG erhalten hatten, waren die Unterschiede zur Kontrollgruppe weit auffälliger. Ihr Wachstum stagnierte nahezu von P7 bis etwa P9, von P7 auf P8 war sogar eine leichte Gewichtsabnahme von $0,11 \pm 0,47$ g zu verzeichnen. Auf P9 nahmen die Tiere nur $0,69 \pm 0,72$ g zu, auf P10 nur $1,01 \pm 0,54$ g. Ab P10 verlief die Wachstumskurve aber wieder parallel zu der Kurve der Kontrolltiere. Das Gewicht lag hierbei ab P10 im Mittel allerdings $5,52 \pm 0,75$ g unter dem Gewicht der Kontrolltiere (siehe Tabelle 1).

Alter in Tagen	Kontrolle Gewicht in g \pm STAB	50 mg PB/kg KG Gewicht in g \pm STAB	87,5 mg PB/kg KG Gewicht in g \pm STAB
P6	12,00 \pm 1,82	12,37 \pm 1,52	11,17 \pm 2,18
P7	13,07 \pm 1,94	13,83 \pm 1,66	12,61 \pm 1,50
P8	15,55 \pm 2,15	14,68 \pm 1,93 **	12,50 \pm 1,53 **
P9	17,17 \pm 2,48	16,67 \pm 2,39 **	13,00 \pm 1,71 **
P10	18,87 \pm 2,54	18,91 \pm 2,40 **	13,56 \pm 1,73 **
P11	21,05 \pm 2,83	21,38 \pm 2,90	15,30 \pm 1,92 **
P12	21,63 \pm 2,14	21,80 \pm 1,34	16,31 \pm 1,98 **
P13	23,17 \pm 2,53	23,57 \pm 1,41	18,00 \pm 2,21 **
P14	24,73 \pm 2,65	25,03 \pm 1,44	19,18 \pm 2,10 **
P15	26,75 \pm 181	26,40 \pm 0,90	21,95 \pm 1,72 **
P16	28,16 \pm 1,90	27,76 \pm 1,01	23,24 \pm 1,77 **
P17	29,58 \pm 2,09	29,12 \pm 1,01	24,66 \pm 1,79 **
P18	31,12 \pm 2,35	31,10 \pm 1,26	25,84 \pm 1,86 **
P19	33,33 \pm 2,58	33,43 \pm 1,50	27,53 \pm 1,97 **
P20	35,12 \pm 3,28	35,89 \pm 1,86	29,33 \pm 2,43 **
P21	39,81 \pm 3,12	40,33 \pm 2,44	32,17 \pm 3,12 **

Tabelle 1 Wistar-Ratten erhielten an P7 50 bzw. 87,5 mg PB/kg KG oder eine Trägerlösung ohne Wirkstoff intraperitoneal injiziert. Ab P6 wurden die Tiere bis zu ihrer Tötung (spätestens an P21) täglich gewogen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Versuchsgruppen zur Kontrollgruppe sind mit ** gekennzeichnet.

4.1.2 Belastungsgrad

Die Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer nach den Kriterien der unter Kapitel 3.3.2 genannten Belastungstabelle beurteilt. Hierbei zeigten die Tiere der Kontrollgruppe keinerlei Zeichen einer Belastung nach Durchführung der Injektion. Es waren weder Auffälligkeiten im Verhalten zu beobachten, noch nahmen sie an Körpergewicht ab. Ebenso wenig war eine Stagnation im Wachstum zu verzeichnen. Auch die Hauttemperatur der Tiere war nicht auffällig vermindert.

Die zu erwartende sedierende Wirkung bei den mit 50 mg PB/kg KG behandelten Tieren war nach 12 Stunden, dem Zeitpunkt der ersten klinischen Kontrolle, gemäß den Kriterien der Belastungstabelle nicht mehr zu verzeichnen.

Die Tiere aus der Versuchsgruppe, die 87,5 mg PB/kg KG erhalten hatten, zeigten bereits am Versuchstag etwa 12 Stunden nach der PB-Injektion erste Zeichen einer Belastung, was sich vor allem in einer sichtbaren Sedierung äußerte. Besonders aber am Tag nach der PB-Injektion (P8) fielen deutlich erhöhte Werte im Belastungsscore auf. Diese kamen zum einen durch die zum Teil erhebliche Sedierung zustande. Die Sedierung äußerte sich darin, dass die Tiere die meiste Zeit schliefen und so gut wie keine Spontanmotorik zeigten. Zum anderen fiel bei vielen Tieren eine verminderte Körperoberflächentemperatur auf, was sich durch auffällig kalte Pfoten und kalte Haut bemerkbar machte. Außerdem zeigten die Tiere der Versuchsgruppe im Gegensatz zu den Kontrolltieren von P7 auf P8 eine leichte Gewichtsabnahme und von P8 bis zu P10 nur eine sehr geringe Zunahme des Körpergewichts. Die Werte im Belastungsscore nahmen jedoch in den darauffolgenden Tagen immer weiter ab, bis ab P13 bei den Tieren dieser Versuchsgruppe keine erhöhte Belastung mehr im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten war.

Insgesamt musste bei drei Tieren, die 87,5 mg PB/kg KG erhalten hatten, der Versuch vorzeitig abgebrochen werden, da ihre Werte im Belastungsscore den definierten Grenzwert zum Versuchsabbruch überschritten hatten. Dies entsprach 1,04 % aller Versuchstiere.

4.1.3 Verstorbene Tiere

Während der Versuche starben insgesamt acht Tiere, das heißt 2,78 % aller Versuchstiere, ohne dass zuvor zu hohe Werte im Belastungsscore einen Versuchsabbruch notwendig gemacht hätten. Sieben der Tiere hatten zuvor 87,5 mg PB/kg KG erhalten, eines der verstorbenen Tiere stammte aus der Kontrollgruppe. Dieses Kontrolltier und drei der verstorbenen Versuchstiere stammten aus dem selben Wurf. Zwei weitere verstorbene Versuchstiere stammten ebenfalls aus einem Wurf. Die übrigen beiden verstorbenen Tiere waren keine Wurfgeschwister.

4.2 Hirngewicht

Nach der Tötung der Tiere erfolgte die Hirnentnahme. Unmittelbar im Anschluss daran wurde jedes Gehirn gewogen, bevor das Gewebe geteilt wurde.

Das Hirngewicht entwickelte sich in der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe, die 50 mg PB/kg KG erhalten hatte so, dass die Gehirnmasse von P8 bis P21 kontinuierlich zunahm. Die Gehirne wogen an P8 $76 \pm 0,04$ g bzw. $70 \pm 0,04$ g und waren bei den Tieren, die an P21 getötet wurden, $1,46 \pm 0,06$ g bzw. $1,44 \pm 0,04$ g schwer.

Das Hirngewicht der Versuchsgruppe mit der Dosierung 87,5 mg PB/kg KG lag ab P9 bis P14 signifikant ($p < 0,05$) unter der Kontrollgruppe. An P21, dem letzten untersuchten Tag der Studie war der Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe (87,5 mg PB/kg KG) nicht mehr signifikant ($1,46 \pm 0,06$ g in der Kontrollgruppe vs. $1,36 \pm 0,09$ g in der Versuchsgruppe an P21) (siehe Abbildung 5).

Während des gesamten Beobachtungszeitraumes ergaben sich in allen drei Gruppe so gut wie keine signifikanten Unterschiede in dem Verhältnis von Hirn- zu Körpergewicht. Die einzige Ausnahme stellte die Versuchsgruppe mit der therapeutischen PB-Dosierung an P9 dar. Ansonsten lag das Verhältnis von Hirn- zu Körpergewicht im Mittel bei 0,05 an den Tagen P8, P9, P10, P11 und P14 und war in allen drei Gruppen an P21 auf 0,04 abgefallen.

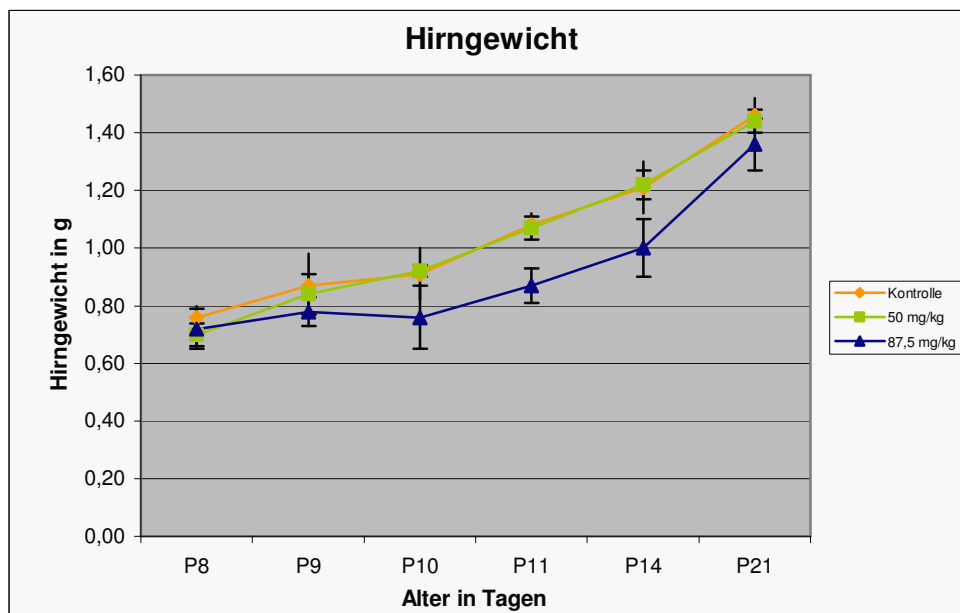
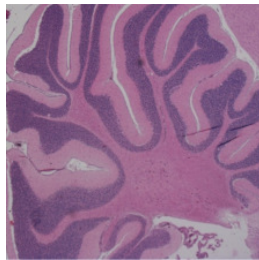
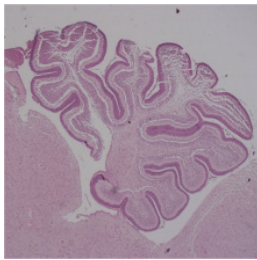


Abbildung 5 Graphische Darstellung des Hirngewichts an den Tagen P8 bis P11, P14 und P21. Neugeborenen Wistar-Ratten wurde am siebten Lebenstag (P7) 50 mg PB/kg KG, 87,5 mg PB/kg KG bzw. NaCl als Kontrolllösung als Einmalgabe intraperitoneal injiziert. Nach ihrer Tötung zwischen P8 und P21 wurden das jeweilige Hirngewicht bestimmt.

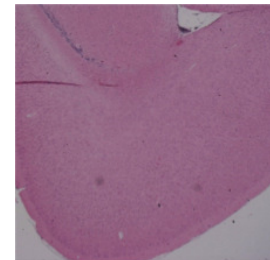
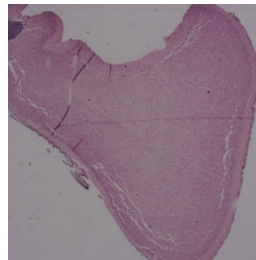
4.3 Zelldichte

Aus den drei Gruppen an den sechs unterschiedlichen Endpunkten der Studie (P8, P9, P10, P11, P14 und P21) wurden je drei mit HE gefärbte Hirnschnitte zufällig ausgewählt. Aus diesen Präparaten wurde für die ausgewerteten Hirnregionen (Frontalcortex, Striatum, Parietalcortex, Thalamus, Gyrus dentatus, Hippocampus 1-4 und Cerebellum) die Anzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bzw. pro mm^2 bestimmt.

Die größte Zelldichte wurde im Cerebellum gemessen mit 18227 ± 7971 Zellen/ mm^2 an P8 und 25755 ± 3496 Zellen/ mm^2 an P21 in der Kontrollgruppe (siehe Abbildungen 6 und 7). Die übrigen Hirnregionen wiesen eine geringere Zellzahl pro Gesichtsfeld auf, die in allen diesen Regionen auf etwa dem gleichen Niveau lag. Im Frontalcortex beispielsweise betrug die Zelldichte an P8 $4541,41 \pm 2533,89$ Zellen/ mm^2 und an P21 $2799,00 \pm 969,17$ Zellen/ mm^2 (siehe Abbildungen 8 und 9).



Abbildungen 6 und 7 Dargestellt sind zwei Hirnschnittpräparate des Cerebellums einer 8 Tage alten Ratte im Vergleich zu dem einer 21 Tage alten Ratte. HE-Färbung, 2fache Vergrößerung.



Abbildungen 8 und 9 Dargestellt sind zwei Hirnschnittpräparate des Frontalcortex einer 8 Tage alten Ratte im Vergleich zu dem einer 21 Tage alten Ratte. HE-Färbung, 2fache Vergrößerung.

Es zeigten sich im Zeitverlauf von P8 bis P21 kaum Unterschiede hinsichtlich der Zelldichte. Auch zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen ließen sich nur wenige Unterschiede auf Signifikanzniveau nachweisen. Differenzen zeigten sich zwischen der Kontrollgruppe und der mit 87,5 mg PB/kg KG behandelten Gruppe an P8 im Striatum, an P9 im Cerebellum, an P11 im Frontalcortex und an P21 in Frontalcortex und Hippocampus, HC1. In der Behandlungsgruppe wurden an diesen Tagen in den genannten Hirnregionen signifikant weniger Zellen (Signifikanzniveau $P < 0,05$) gezählt als in der Vergleichsgruppe, mit der Ausnahme von P21 im Frontalcortex. Hier ergaben sich in der Versuchsgruppe mit der supratherapeutischen PB-Dosis mehr Zellen als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildungen 10-15).

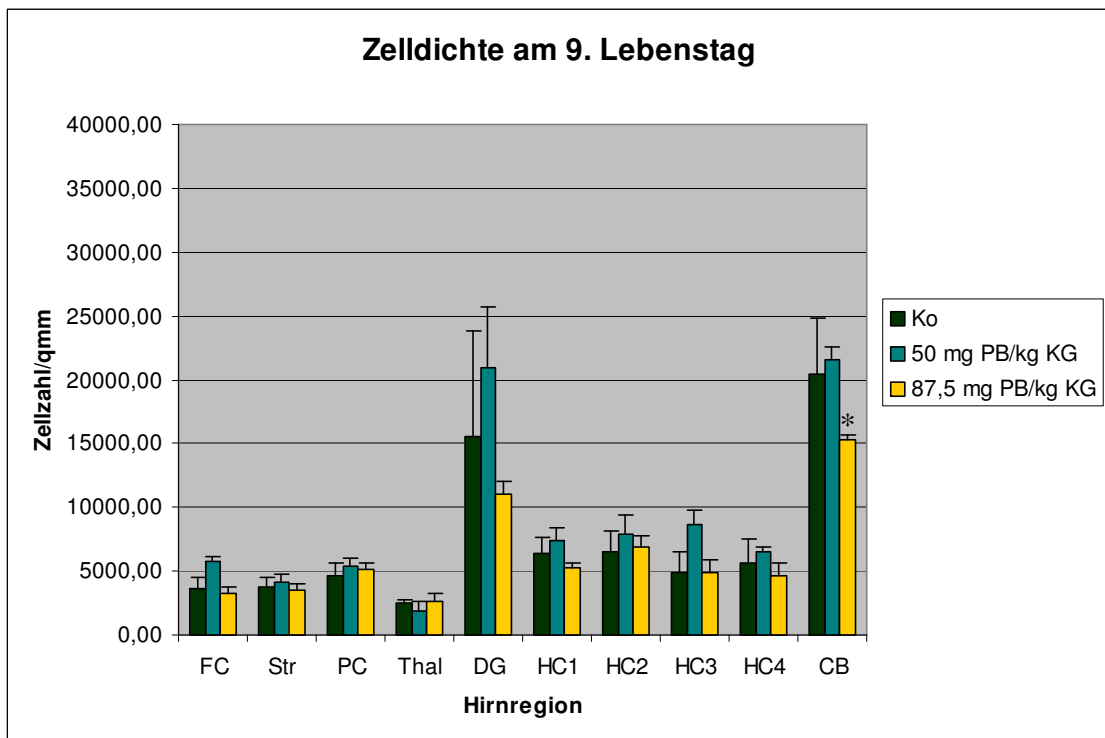
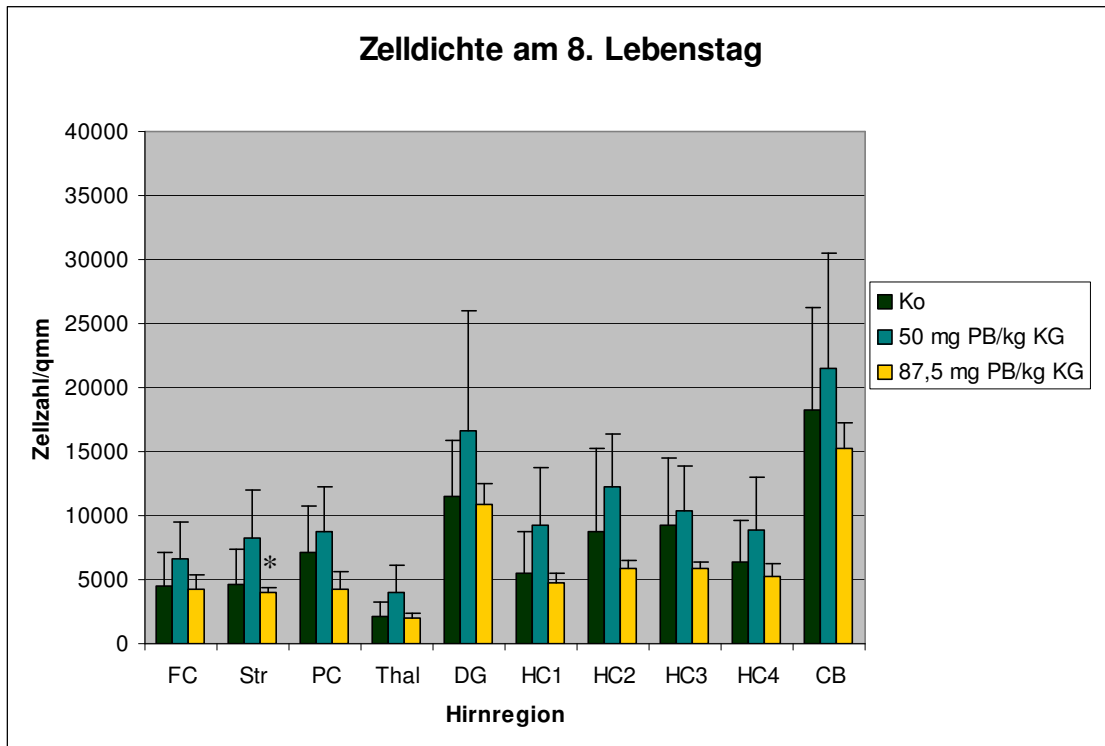


Abbildung 10 und 11 Graphische Darstellung der Zellzahlen pro mm² (qmm) in verschiedenen Hirnregionen an P8 und P9, d. h. einen bzw. zwei Tage nach Injektion der Kontroll- oder PB-Lösung (50 bzw. 87,5 mg PB/kg KG). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet. (FC – Frontalcortex, Str – Striatum, PC – Parietalcortex, Thal – Thalamus, DG – Gyrus dentatus, CA1-CA4 – Regionen des Hippocampus, CB – Cerebellum)

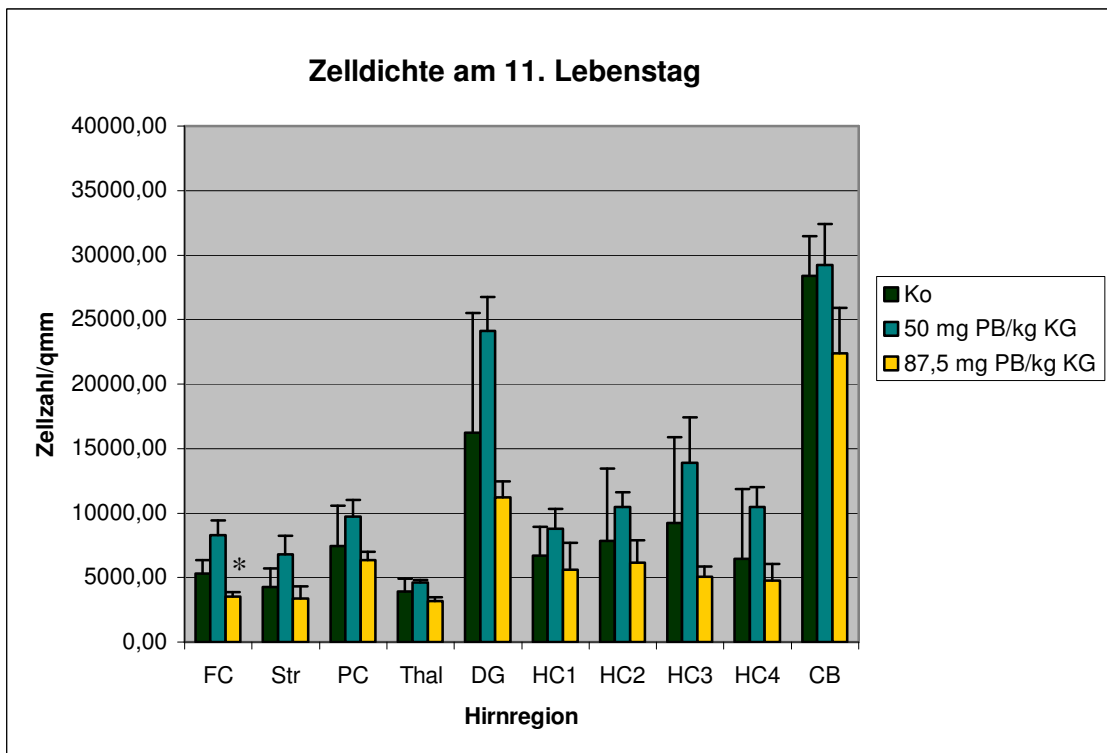
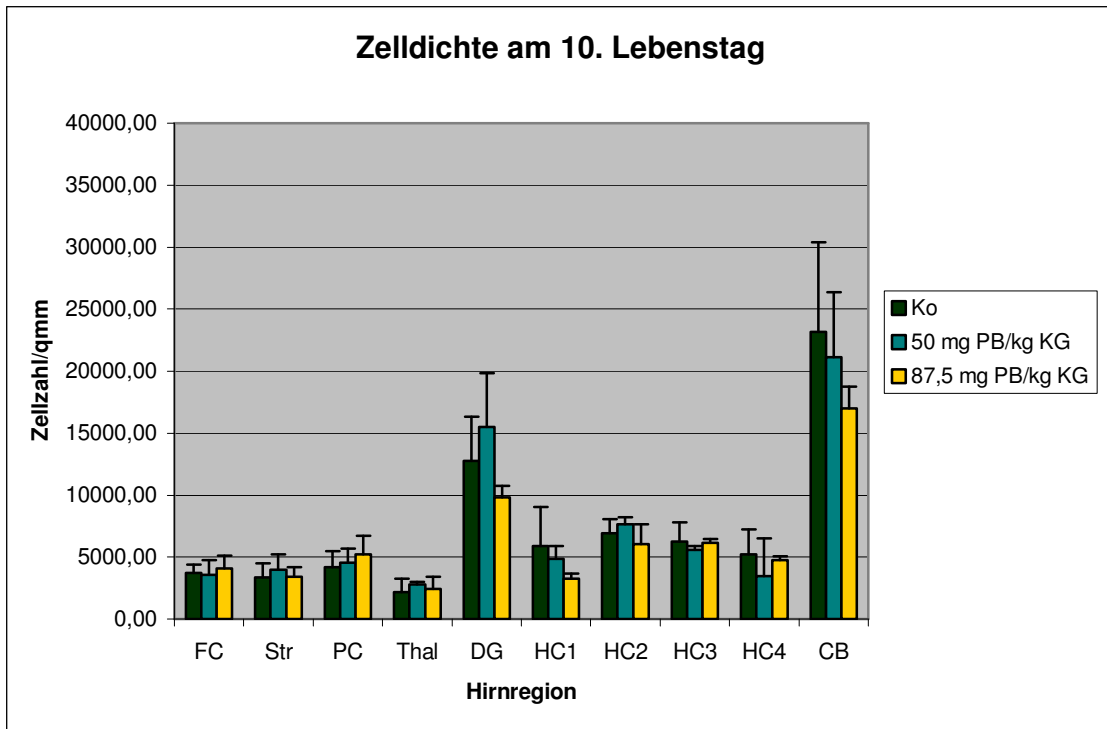


Abbildung 12 und 13 Graphische Darstellung der Zellzahlen pro mm² (qmm) in verschiedenen Hirnregionen an P10 und P11, d. h. drei bzw. vier Tage nach Injektion der Kontroll- oder PB-Lösung (50 bzw. 87,5 mg PB/kg KG). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet. (FC – Frontalcortex, Str – Striatum, PC – Parietalcortex, Thal – Thalamus, DG – Gyrus dentatus, CA1-CA4 – Regionen des Hippocampus, CB – Cerebellum)

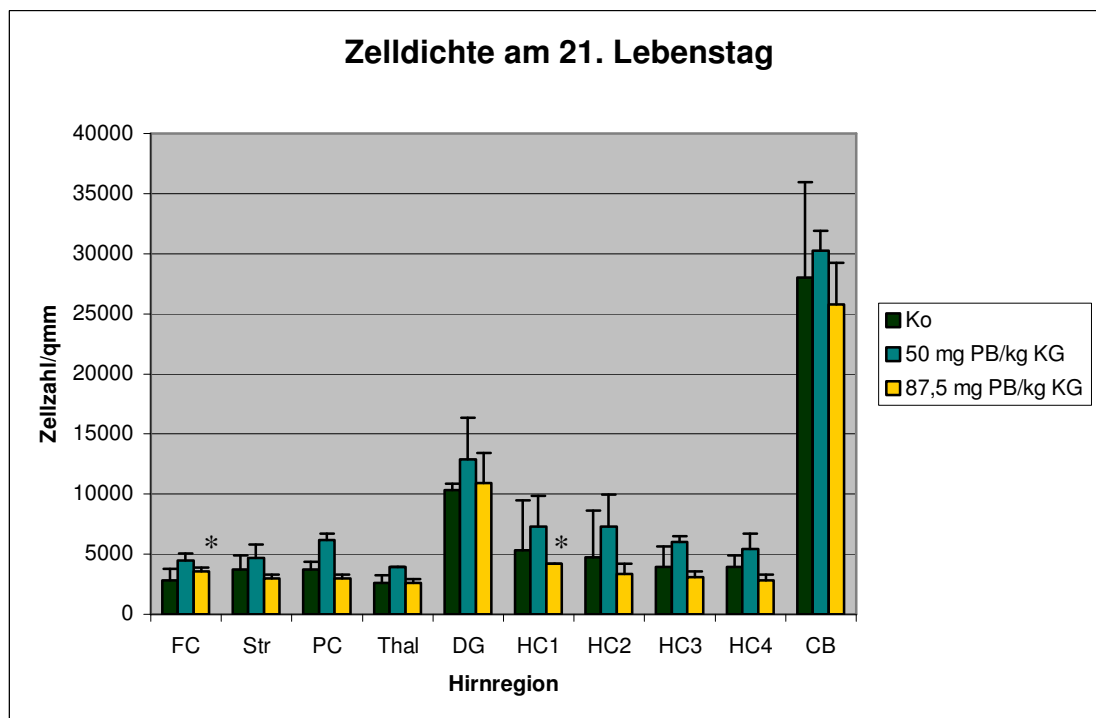
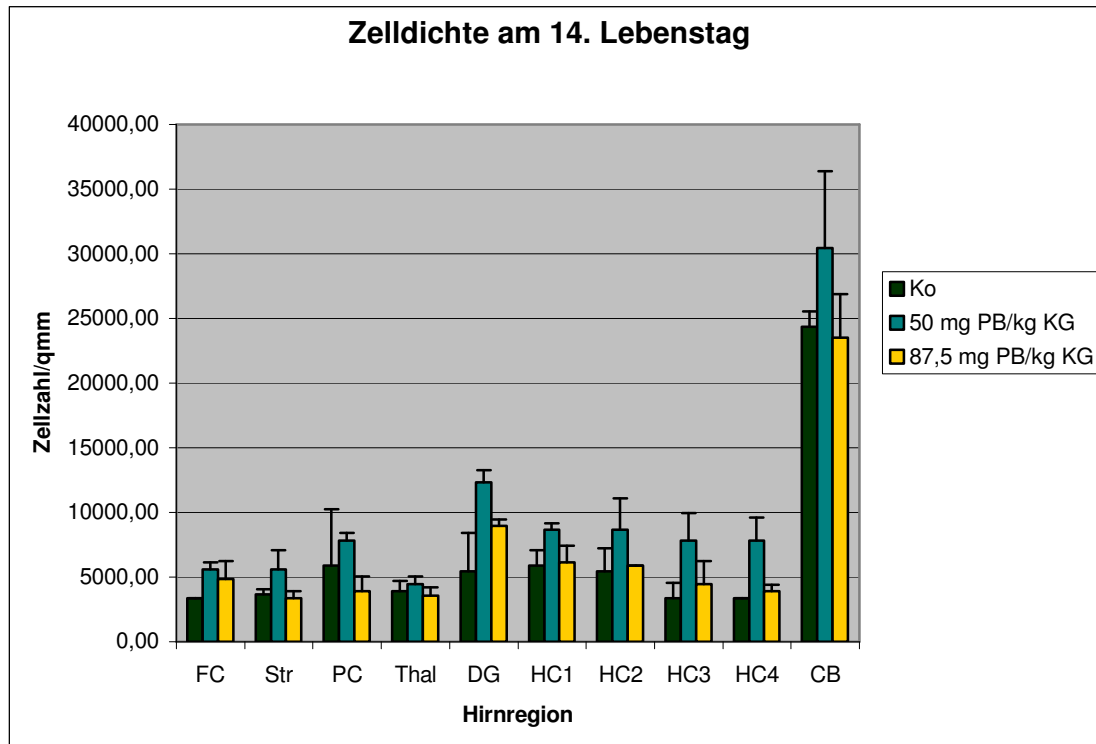


Abbildung 14 und 15 Graphische Darstellung der Zellzahlen pro mm² (qmm) in verschiedenen Hirnregionen an P14 und P21, d. h. sieben bzw. 14 Tage nach Injektion der Kontroll- oder PB-Lösung (50 bzw. 87,5 mg PB/kg KG). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet. (FC – Frontalcortex, Str – Striatum, PC – Parietalcortex, Thal – Thalamus, DG – Gyrus dentatus, CA1-CA4 – Regionen des Hippocampus, CB – Cerebellum)

4.4 Apoptoserate

In der HE-Färbung stellten sich die apoptotischen Zellen mit einem typischen dunkellila gefärbten Zellkern dar, der entweder deutlich kondensiert oder bereits fragmentiert war. Normale Nervenellen hatten einen deutlich größeren Zellkern, der weniger kräftig angefärbt war und zudem rund und nicht fragmentiert war (siehe Abbildung 16).

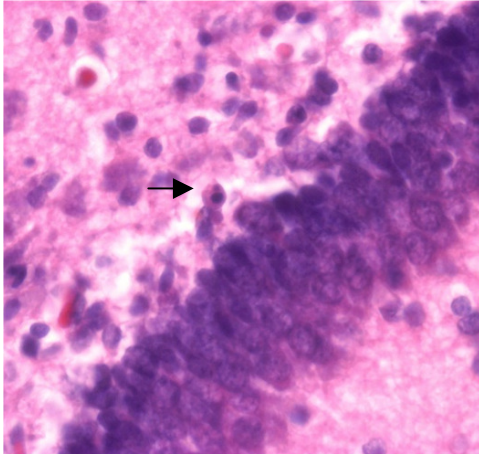


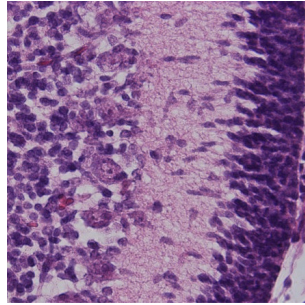
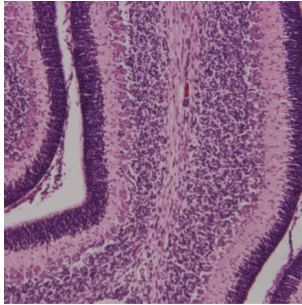
Abbildung 16 Dargestellt ist ein Ausschnitt des Gyrus dentatus im Hirnschnittpräparat einer 10 Tage alten Wistar-Ratte in 40facher Vergrößerung. Eine typische apoptotische Zelle mit heller angefärbtem Zytoplasma und fragmentiertem Zellkern ist mit dem Pfeil markiert.

In der Kontrollgruppe wurden an den untersuchten Tagen (P8, P9, P10, P11, P14 und P21) in allen Hirnregionen maximale Werte an apoptotischen Zellen an P8 gezählt mit Werten zwischen $1,05 \pm 1,72$ apoptotischen Zellen/mm² im Hippocampus (HC4) und $14,22 \pm 5,92$ apoptotischen Zellen/mm² im Cerebellum. Danach war eine Abnahme der apoptotischen Zellen bis P21 zu beobachten auf keine nachweisbare Apoptose im Hippocampus, HC2 und HC3, bis $3,72 \pm 3,18$ apoptotische Zellen/mm² im Cerebellum.

Die mit 50 mg PB/kg KG behandelten Tiere zeigten in der HE-Färbung keine signifikant gesteigerte Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es konnte auch hier ein Maximum der Apoptoserate an P8 mit einem Abfall bis P21 gezeigt werden.

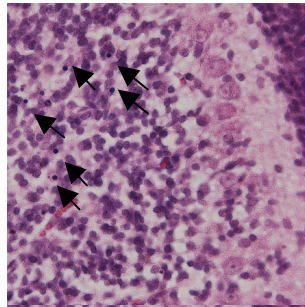
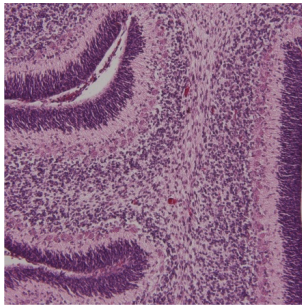
In der Versuchsgruppe, die 87,5 mg PB/kg KG injiziert bekommen hatte, ließen sich mehr apoptotische Zellen als in den beiden anderen Gruppen nachweisen. Es wurde jedoch nur in einigen Hirnregionen an bestimmten Tagen Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht. An P10 ergaben sich in der Apoptoserate Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe auf Signifikanzniveau ($p < 0,05$) lediglich im Cerebellum ($12,53 \pm 7,74$ vs. $30,80 \pm 12,37$ apoptotische Zellen/mm²). An P11 wurden in vier verschiedenen Hirnregionen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl

apoptotischer Zellen gemessen: $1,93 \pm 1,33$ vs. $2,46 \pm 0,97$ apoptotische Zellen/mm² im Frontalcortex, $1,00 \pm 0,92$ vs. $2,22 \pm 1,37$ apoptotische Zellen/mm² im Striatum, $0,91 \pm 1,02$ vs. $2,57 \pm 1,21$ apoptotische Zellen/mm² im Thalamus und $6,11 \pm 5,03$ vs. $29,86 \pm 19,72$ apoptotische Zellen/mm² im Cerebellum. An allen übrigen Tagen waren keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe nachweisbar (siehe Abbildungen 17 bis 24 und Tabellen 2 bis 4).



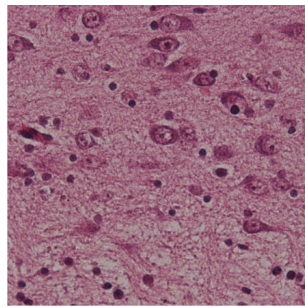
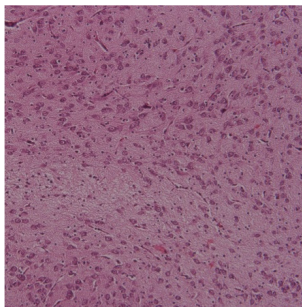
Abbildungen 17 und 18

Dargestellt ist ein Hirnschnittpräparat des Cerebellums einer 10 Tage alten Wistar-Ratte. HE-Färbung, 10fache und 40fache Vergrößerung.



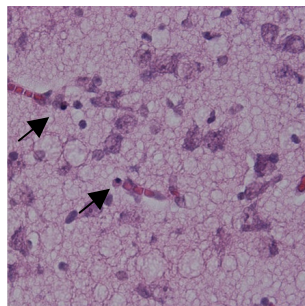
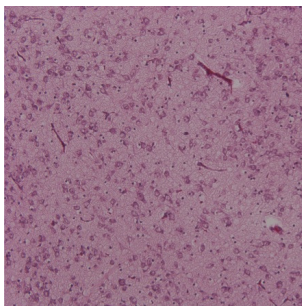
Abbildungen 19 und 20

Dargestellt ist ein Hirnschnittpräparat des Cerebellums einer 10 Tage alten Wistar-Ratte, die am 7. Lebenstag 87,5 mg PB/kg KG erhalten hatte. Apoptotische Zellen sind mit einem Pfeil markiert. HE-Färbung, 10fache und 40fache Vergrößerung.



Abbildungen 21 und 22

Dargestellt ist ein Hirnschnittpräparat des Thalamus einer 11 Tage alten Wistar-Ratte. HE-Färbung, 10fache und 40fache Vergrößerung.



Abbildungen 23 und 24

Dargestellt ist ein Hirnschnittpräparat des Thalamus einer 11 Tage alten Wistar-Ratte, die am 7. Lebenstag 87,5 mg PB/kg KG erhalten hatte. Apoptotische Zellen sind mit einem Pfeil markiert. HE-Färbung, 10fache und 40fache Vergrößerung.

Ergebnisse

Alter	P8			P9		
	Kontrolle	50 mg PB/kg KG	87,5 mg PB/kg KG	Kontrolle	50 mg PB/kg KG	87,5 mg PB/kg KG
Hirn- region	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB
FC	3,58 ± 3,07	5,83 ± 4,75	3,09 ± 2,89	12,21 ± 1,76	2,46 ± 1,41	1,68 ± 1,79
Str	6,82 ± 5,77	9,44 ± 8,17	13,24 ± 9,65	2,81 ± 2,25	2,39 ± 2,44	2,50 ± 2,03
PC	4,23 ± 2,56	6,54 ± 2,55	6,37 ± 4,94	2,59 ± 2,19	1,40 ± 1,07	4,07 ± 3,35
Thal	3,18 ± 4,67	2,70 ± 2,74	10,69 ± 9,01	0,99 ± 1,10	1,99 ± 2,49	4,63 ± 7,80
DG	1,84 ± 1,70	3,42 ± 2,50	2,98 ± 3,53	0,70 ± 1,04	0,18 ± 0,43	0,00 ± 0,00
HC1	5,13 ± 4,61	4,47 ± 2,86	12,28 ± 10,81	1,23 ± 1,41	1,05 ± 1,76	4,91 ± 10,15
HC2	2,37 ± 2,42	3,42 ± 2,23	2,98 ± 2,76	0,18 ± 0,61	0,70 ± 1,09	0,21 ± 0,67
HC3	1,32 ± 1,51	2,11 ± 2,76	3,33 ± 3,75	0,70 ± 1,37	1,05 ± 1,76	1,26 ± 1,47
HC4	1,05 ± 1,72	1,05 ± 1,13	0,88 ± 1,41	1,05 ± 2,46	1,05 ± 2,58	0,00 ± 0,00
CB	14,22 ± 5,92	10,35 ± 3,04	12,21 ± 8,55	11,63 ± 9,35	11,58 ± 9,24	18,32 ± 7,77

Tabelle 2 Neugeborenen Wistar-Ratten wurde am siebten Lebenstag (P7) 50mg PB/kg KG, 87,5 mg PB/kg KG bzw. NaCl als Kontrolllösung als Einmalgabe intraperitoneal injiziert. Nach ihrer Tötung zwischen P8 und P21 wurden aus dem entnommenen Hirngewebe histologische Schnittpräparate angefertigt, die mit HE angefärbt worden waren. Die Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. In der Tabelle ist die Anzahl apoptotischer Zellen (n) pro mm² an P8 und P9 im Vergleich zur Kontrollgruppe angegeben. Signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den beiden Gruppen sind mit ** markiert. (FC – Frontalcortex, Str – Striatum, PC – Parietalcortex, Thal – Thalamus, DG – Gyrus dentatus, HC1-HC4 – Regionen des Hippocampus, CB – Cerebellum)

Ergebnisse

Alter	P10			P11		
	Kontrolle	50 mg PB/kg KG	87,5 mg PB/kg KG	Kontrolle	50 mg PB/kg KG	87,5 mg PB/kg KG
Hirn- region	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB
FC	2,53 ± 1,59	1,97 ± 1,40	1,90 ± 1,81	1,93 ± 1,33	2,88 ± 2,02	2,46 ± 0,97 **
Str	1,54 ± 1,31	1,82 ± 1,20	2,63 ± 2,19	1,00 ± 0,92	1,48 ± 1,21	2,22 ± 1,37 **
PC	1,26 ± 1,07	2,11 ± 1,19	2,25 ± 1,51	1,72 ± 1,32	3,23 ± 2,85	1,52 ± 0,94
Thal	1,08 ± 0,70	1,26 ± 1,09	1,47 ± 1,12	0,91 ± 1,02	1,95 ± 1,10	2,57 ± 1,21 **
DG	0,42 ± 0,87	1,26 ± 1,47	0,63 ± 1,02	0,67 ± 1,08	0,70 ± 1,15	0,00 ± 0,00
HC1	0,98 ± 1,35	0,63 ± 1,02	1,05 ± 1,49	0,11 ± 0,47	0,42 ± 0,89	1,05 ± 1,68
HC2	0,28 ± 0,74	0,63 ± 1,02	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,66	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,61
HC3	0,00 ± 0,00	0,21 ± 0,67	1,05 ± 1,49	0,07 ± 0,32	0,86 ± 1,48	1,05 ± 1,90
HC4	0,28 ± 0,74	0,63 ± 1,02	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,66	0,21 ± 0,67	0,18 ± 0,61
CB	12,53 ± ,74	9,20 ± 3,11	30,80 ± 12,37 **	6,11 ± 5,03	1,68 ± 1,16	29,86 ± 19,72 **

Tabelle 3 Neugeborenen Wistar-Ratten wurde am siebten Lebenstag (P7) 50mg PB/kg KG, 87,5 mg PB/kg KG bzw. NaCl als Kontrolllösung als Einmaldosis intraperitoneal injiziert. Nach ihrer Tötung zwischen P8 und P21 wurden aus dem entnommenen Hirngewebe histologische Schnittpräparate angefertigt, die mit HE angefärbt worden waren. Die Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. In der Tabelle ist die Anzahl apoptotischer Zellen (n) pro mm² an P10 und P11 im Vergleich zur Kontrollgruppe angegeben. Signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den beiden Gruppen sind mit ** markiert. (FC – Frontalcortex, Str – Striatum, PC – Parietalcortex, Thal – Thalamus, DG – Gyrus dentatus, HC1-HC4 – Regionen des Hippocampus, CB – Cerebellum)

Ergebnisse

Alter	P14			P21		
	Kontrolle	50 mg PB/kg KG	87,5 mg PB/kg KG	Kontrolle	50 mg PB/kg KG	87,5 mg PB/kg KG
Hirn- region	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB	n/mm ² ± STAB
FC	0,96 ± 1,08	0,70 ± 0,57	1,13 ± 1,87	0,53 ± 0,60	0,42 ± 0,59	0,47 ± 0,70
Str	0,48 ± 0,66	0,49 ± 0,47	0,54 ± 0,65	0,25 ± 0,52	0,35 ± 0,50	0,08 ± 0,23
PC	0,63 ± 0,81	1,19 ± 0,67	0,43 ± 0,54	0,42 ± 0,42	0,42 ± 0,49	0,55 ± 0,91
Thal	1,07 ± 0,86	1,75 ± 1,06	0,32 ± 0,46	0,60 ± 0,52	0,63 ± 0,77	0,55 ± 0,58
DG	0,33 ± 0,79	0,84 ± 1,47	0,32 ± 0,79	0,63 ± 1,20	1,05 ± 1,49	0,00 ± 0,00
HC1	0,11 ± 0,48	0,23 ± 0,70	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,48	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
HC2	0,22 ± 0,66	0,21 ± 0,67	0,16 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
HC3	0,11 ± 0,48	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
HC4	0,78 ± 1,26	0,63 ± 1,42	0,16 ± 0,58	0,11 ± 0,47	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CB	1,96 ± 1,40	0,61 ± 1,15	3,51 ± 2,70	3,72 ± 3,18	1,82 ± 1,76	5,85 ± 3,99

Tabelle 4 Neugeborenen Wistar-Ratten wurde am siebten Lebenstag (P7) 50mg PB/kg KG, 87,5 mg PB/kg KG bzw. NaCl als Kontrolllösung als Einmalgabe intraperitoneal injiziert. Nach ihrer Tötung zwischen P8 und P21 wurden aus dem entnommenen Hirngewebe histologische Schnittpräparate angefertigt, die mit HE angefärbt worden waren. Die Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. In der Tabelle ist die Anzahl apoptotischer Zellen (n) pro mm² an P14 und P21 im Vergleich zur Kontrollgruppe angegeben. Signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den beiden Gruppen sind mit ** markiert. (FC – Frontalcortex, Str – Striatum, PC – Parietalcortex, Thal – Thalamus, DG – Gyrus dentatus, HC1-HC4 – Regionen des Hippocampus, CB – Cerebellum)

4.5 Von der Studie ausgeschlossene Tiere

Ein Tier aus der Versuchsgruppe, die 87,5 mg PB/kg KG erhalten hatte, wurde im Nachhinein von der Studie ausgeschlossen, da sich bei der Auswertung der Apoptoserate Werte ergaben, die im Vergleich zu den anderen Tieren der gleichen Versuchsgruppe in den meisten Hirnregionen um etwa das 20- bis 80-fache erhöht waren. Als Ursache hierfür waren Fehler in der Methodik nicht auszuschließen. Da die Apoptoserate in der Auswertung aller drei Methoden massiv erhöht war, lag der Fehler vermutlich in der Tötung des Tieres bzw. bei der Hirnentnahme. Dass diese massive Erhöhung der Apoptoserate eine Folge der PB-Behandlung war, ist eher unwahrscheinlich, da ein so große Anzahl apoptotischer Zellen nur bei diesem einen Tier gemessen wurden, nicht aber bei den anderen Tieren der gleichen Versuchsgruppe. Aus diesem Grund flossen die Daten dieses Tieres nicht mit in die statistische Auswertung ein, um mögliche Folgefehler bei der Bildung der Mittelwerte und Standardabweichungen innerhalb dieser Versuchsgruppe zu vermeiden.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse

5.1.1 Klinische Beobachtungen

Die Tiere wurden nach den Kriterien einer Belastungstabelle täglich begutachtet und gewogen. Dabei zeigten die Tiere der Kontrollgruppe kein auffälliges Verhalten gemäß den Kriterien der Tabelle. Von P6, dem ersten Tag der Gewichtskontrolle, bis zu P20 nahmen die Tiere dieser Gruppe täglich durchschnittlich $1,68 \pm 0,56$ g zu. Diese Entwicklung des Körpergewichts stimmt mit einer Studie von Bührdel et al. (Bührdel et al. 1978) zur physiologischen Wachstumskurve neugeborener Ratten überein, die Tiere entwickelten sich demzufolge regelrecht. Von P20 auf P21 nahmen die Kontrolltiere im Mittel $4,69 \pm 2,41$ g zu. Dieser sprunghafte Anstieg der Gewichtszunahme lässt sich dadurch erklären, dass die Tiere etwa ab dem Tag P20 groß genug waren, um an das Futter der Mutter zu gelangen, das in einigen Zentimetern Höhe im Käfig angebracht war. Dadurch ernährten sich die jungen Ratten zusätzlich zur Muttermilch von Standardfutter, was in einer erhöhten Kalorienzufuhr und damit stärkeren Gewichtszunahme resultierte.

Die klinischen Beobachtungen der Versuchsgruppe, die 50 mg PB/kg KG injiziert bekommen hatte, unterschieden sich kaum von denen der Kontrollgruppe. Die Tiere verhielten sich unauffällig und zeigten ähnlich den Kontrolltieren eine regelrechte physiologische Zunahme des Körpergewichts (Bührdel et al. 1978). Ebenso war ein Gewichtssprung von P20 auf P21 zu verzeichnen. Die einzige Ausnahme fiel am Tag P8, dem Tag nach der PB-Injektion, auf. Auf diesen Tag hatten die Tiere deutlich weniger zugenommen als die Kontrolltiere. Ursächlich hierfür war vermutlich eine geringe Sedierung durch das PB, die sich zwar nicht sichtbar auf das Verhalten ausgewirkt hatte, aber offenbar eine vorübergehende Trinkschwäche zur Folge hatte. Der Unterschied zur Kontrollgruppe machte sich allerdings nur in der Gewichts Differenz zwischen P7 und P8, nicht aber im Körpergewicht selbst an P8 bemerkbar.

Die Tiere der Versuchsgruppe, die an P7 87,5 mg PB/kg KG injiziert bekommen hatten, zeigten noch am selben Tag deutlich Zeichen einer Belastung durch die PB-Applikation. Sie fielen durch eine zum Teil erhebliche Sedierung auf, die als bekannte unerwünschte Arzneimittelwirkung des PB auftrat. Zudem zeigten die Tiere in den ersten Tagen nur eine

geringe Gewichtszunahme bzw. sogar Gewichtsabnahme. Diese Beobachtungen lassen sich damit erklären, dass die Tiere durch die Sedierung nicht mehr in der Lage waren, bei der Mutter zu säugen und damit Nahrung zu sich zu nehmen. Erst ab P10 nahmen die Versuchstiere wieder im gleichen Maße wie ihre Kontrollgeschwister zu, was mit der Tatsache korrelierte, dass etwa ab diesem Tag nur noch eine geringe oder gar keine Sedierung mehr zu beobachten war. Diese Beobachtungen stimmen mit der berichteten Halbwertszeit von 130-500 Stunden (Morselli 1993) und damit indirekt auch der Wirkdauer des Antiepileptikums überein. Der anfängliche Gewichtsverlust der Versuchstiere konnte allerdings nicht mehr aufgeholt werden und ihr Gewicht lag bis P21, dem letzten untersuchten Tag der Studie, im Schnitt $5,52 \pm 0,75$ g unter dem der Kontrolltiere. Dieser Unterschied war ab P8 bis zum Tag P21 statistisch signifikant.

Des Weiteren fielen die meisten Versuchstiere an den Tagen nach der Injektion von 87,5 mg PB/kg KG durch eine spürbar niedrigere Hauttemperatur im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Diese zeitweise Hypothermie lässt sich – wie auch der Gewichtsverlust – durch die Sedierung erklären, da es durch mangelnde Körperbewegungen zu keiner Wärmeproduktion durch Muskeln kam und eine Abkühlung des Körpers die Folge war. Sobald die sedierende Wirkung des PB nachgelassen hatte, normalisierte sich auch die Körpertemperatur der Tiere wieder.

5.1.2 Apoptoserate bei den Kontrolltieren

In der Gruppe der Kontrolltiere zeigte sich an den untersuchten Tagen zwischen P8 und P21 an P8 in allen untersuchten Hirnregionen jeweils die größte Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Hirnregionen an den übrigen untersuchten Tagen. Dieses Maximum der Apoptoseraten an P8, das sich in der Auswertung der mit HE angefärbten Hirnschnitte zeigte, ließ sich sowohl durch Ergebnisse der TUNEL-Färbung als auch der Messung der Caspase-3-Aktivität im Gehirn bestätigen (Eine Zusammenfassung der Daten der TUNEL-Färbung und der Caspase-3-Aktivität findet sich im Anhang unter 9.1 bzw. 9.2.). Mit allen drei Methoden wurde zudem übereinstimmend ein Abfall der Anzahl apoptotischer Zellen von P8 bis zum Endpunkt der Studie an P21 gemessen. Diese Ergebnisse stimmen mit verschiedenen Studien zum physiologischen Verlauf der Apoptoserate im Gehirn neugeborener Ratten überein (Ferrer et al. 1990a,

Ferrer et al. 1990b, Ferrer et al. 1994, Gould et al. 1991), der auf einer maximalen Apoptoserate während der Phase des sogenannten *brain growth spurt* beruht, die dann mit zunehmender Reifung des Gehirns abfällt (Kaufmann 2000) (siehe Abbildung 25).

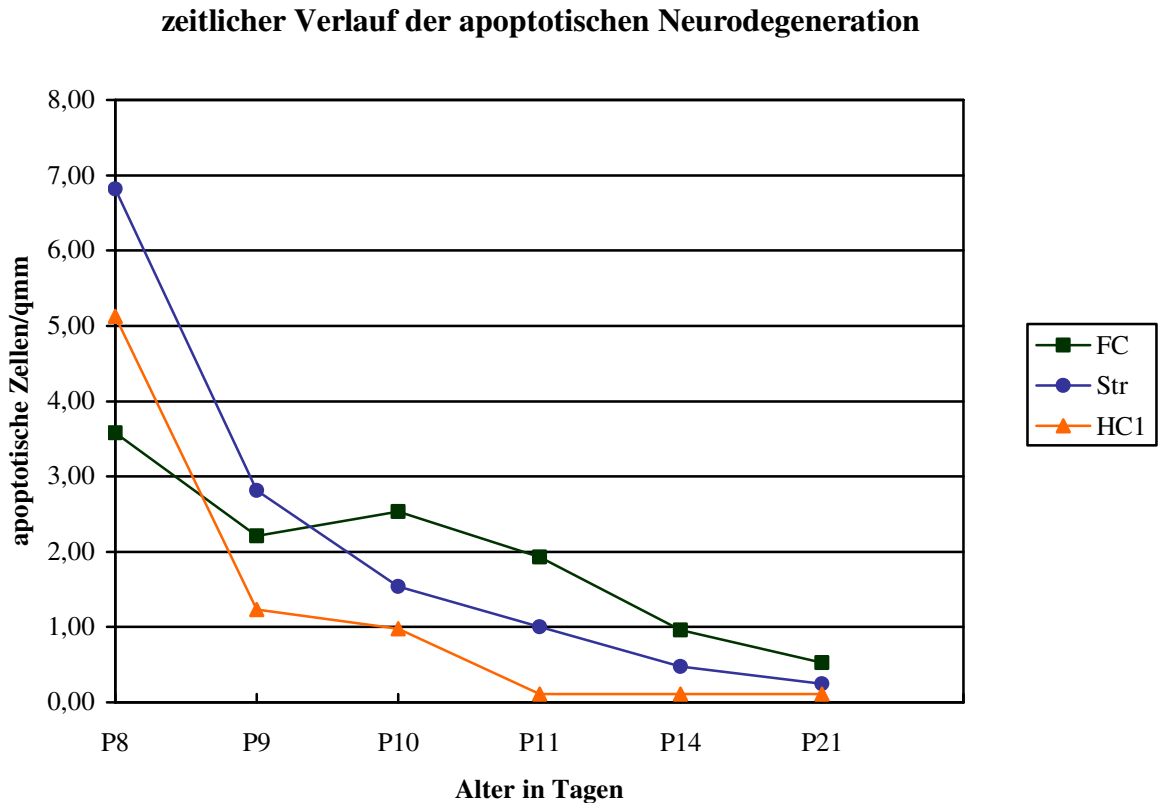


Abbildung 25 Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der physiologischen Apoptoserate in Anzahl apoptotischer Zellen/mm² (qmm) zwischen dem 8. und 21. Lebenstag (P8-P21) in drei ausgewählten Hirnregionen. (FC – Frontalcortex, Str – Striatum, HC1 – Hippocampus)

5.1.3 Apoptoserate bei den Versuchstieren

5.1.3.1 Apoptoserate nach therapeutischer PB-Dosis

In der Versuchsgruppe, die 50 mg PB/kg KG appliziert bekommen hatte, zeigte sich genau wie in der Kontrollgruppe der spontane Verlauf der Apoptoserate mit einem Maximum an P8 und einem Abfall bis P21 (Ferrer et al. 1990a, Ferrer et al. 1990b, Ferrer et al. 1994, Gould et al. 1991). Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl apoptotischer Zellen

waren zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe, die eine therapeutische PB-Dosis erhalten hatte, in der HE-Färbung nicht zu sehen. Mit den Daten der Caspase-3-Aktivität im Gehirn ließ sich dieses Ergebnis untermauern. Auch die TUNEL-Färbung ergab ein ähnliches Ergebnis, lediglich an P8 im Frontalcortex zeigte sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Somit ist die Bedeutung dieses Unterschieds nur als eingeschränkt zu bewerten.

Dieses Ergebnis, dass in allen drei Nachweismethoden für Apoptose so gut wie keine Differenzen zur Kontrollgruppe vorlagen, war zunächst nicht erwartet worden, da zu Beginn der Versuche bei dieser PB-Dosierung von Serumspiegeln auszugehen war, die zu einer Steigerung der apoptotischen Neurodegeneration führten. In der Studie von Bittigau et al. (Bittigau et al. 2002) war bei einer einmaligen Gabe von 40 mg PB/kg KG an P7 bereits eine signifikante Steigerung der Apoptoserate innerhalb von 24 Stunden nachweisbar.

Nach dem Ausbleiben der erwarteten Apoptoseinduktion durch 50 mg PB/kg KG wurden Bestimmungen zu den PB-Serumspiegeln durchgeführt, um zu überprüfen, ob bei gleicher Dosierung andere Werte als in der Studie von Bittigau et al. (Bittigau et al. 2002) erreicht würden. Dieser Verdacht bestätigte sich allerdings nicht. Bei einer Dosierung von 50 mg PB/kg KG wurden in der vorliegenden Studie Serumspiegel von etwa 30 µg PB/ml Serum erreicht, die sich kaum von den in der Arbeit von Bittigau et al. berichteten unterschieden. Somit konnte auf jeden Fall ausgeschlossen werden, dass die Ursache in zu niedrigen PB-Serumspiegeln im Vergleich zur Arbeit von Bittigau et al. lag. Der Unterschied zwischen den beiden Versuchen könnte allerdings ein Hinweis auf genetische Unterschiede zwischen den verwendeten Versuchstieren sein. Es dienten zwar bei beiden Studien sieben Tage alte Wistar-Ratten als Versuchstiere, aber die Tiere stammten aus verschiedenen Zuchten. So wäre es möglich, dass die Ratten durch genetische Variationen unterschiedlich sensibel auf das PB reagierten. Es bleiben als mögliche Folgen der genetischen Diversität zu nennen eine geringere Empfindlichkeit der Tiere auf PB oder ein geringerer Transport des PB aus dem Blut ins Gehirn, so dass niedrigere Liquorspiegel erreicht wurden. Diese Theorie konnte allerdings nicht überprüft werden, da während der Versuche nur PB-Serumspiegel bestimmt wurden. Die Bestimmung der PB-Spiegel im Liquor wäre aufgrund der sehr geringen Liquormenge bei neugeborenen Ratten zudem wahrscheinlich äußerst schwierig gewesen.

5.1.3.2 Apoptoseinduktion durch supratherapeutische PB-Dosis

Die Versuchsgruppe, die 87,5 mg PB/kg KG erhalten hatte, zeigte an den Tagen P10 und P11 in unterschiedlichen Hirnregionen zum Teil signifikant erhöhte Zahlen apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. An den übrigen Tagen waren in der HE-Färbung keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren nachweisbar. Der signifikante Unterschied an P10 im Cerebellum ließ sich weder durch die TUNEL-Färbung noch durch die Messung der Caspase-3-Aktivität bestätigen. Auch das Ergebnis an P11 im Frontalcortex bestätigte sich in keiner der beiden anderen methodischen Nachweise für Apoptose. Dahingegen zeigten sich an den Tagen P8, P9, P11 und P21 signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in der TUNEL-Färbung, der Caspase-3-Aktivität oder auch in beiden Methoden übereinstimmend, die in der HE-Färbung nicht zu sehen waren. Die Unterschiede in der HE-Färbung an P11 in Striatum und Cerebellum zeigten sich jedoch auch in der Auswertung der TUNEL-Färbung und der Wert im Thalamus ließ sich sowohl mit der TUNEL-Färbung als auch mit der Caspase-3-Aktivität untermauern. Zudem war an P14 übereinstimmend in allen drei Methoden keine signifikant erhöhte Apoptoserate in der Versuchsgruppe nachweisbar.

Die erhöhten Zahlen apoptotischer Zellen in der Versuchsgruppe waren also in der Regel nicht mit allen drei Methoden nachweisbar, in einigen Fällen traten sogar nur in einer Nachweismethode signifikante Unterschiede auf. Zudem waren keinerlei Regelmäßigkeiten zu erkennen. So waren beispielsweise im Thalamus an den Tagen P8, P9 und P11, nicht aber an den Tagen P10, P14 und P21 erhöhte Apoptoseraten in der TUNEL-Färbung zu beobachten. In der HE-Färbung ergaben sich für den Thalamus nur an P11 erhöhte Apoptosewerte. Ein weiteres Beispiel ist der Frontalcortex: Vermehrt apoptotische Zellen ergaben sich an P11 in der HE-Färbung und an P21 in der TUNEL-Färbung. Doch obwohl es diese Unregelmäßigkeiten sowohl hinsichtlich der betroffenen Hirnregionen als auch im zeitlichen Verlauf in den statistisch signifikanten Unterschieden zur Kontrollgruppe gibt, so fällt doch trotz allem auf, dass es in der mit 87,5 mg PG/kg KG behandelten Versuchsgruppe diese Unterschiede gab, wohingegen bei den Tieren, die nur 50 mg PB/kg KG erhalten hatten, diese Unterschiede nicht auftraten. Es wäre also möglich, dass es nach einer PB-Dosis über dem therapeutischen Bereich zu einer so geringen Steigerung der neuronalen Apoptose kam, dass die Unterschiede zur Kontrollgruppe nur sporadisch signifikant nachweisbar wurden.

Anhand der Datenlage muss auf jeden Fall mit einer möglichen Steigerung der apoptotischen Neurodegeneration nach einer supratherapeutischen PB-Dosis gerechnet werden, unter anderem auch deswegen, da neben erhöhten Apoptoseraten zum Teil auch erniedrigte Zellzahlen nachgewiesen werden konnten. Diese erniedrigten Zellzahlen waren zwar ebenso nur sporadisch signifikant, wie die vermehrten apoptotischen Zellen, jedoch korrelierte eine verminderte Zelldichte so gut wie immer mit einer Apoptoserhöhung in wenigsten einem methodischen Apoptosenachweis. Dazu kommt, dass an den Tagen P8, P9 und P11 das Hirngewicht der Versuchstiere signifikant unter dem der Kontrolltiere lag. Dies könnte ein Hinweis für einen temporären Zellverlust sein. Möglich wäre allerdings auch, dass der signifikante Hirngewichtsunterschied allein auf das geringere Körpergewicht und damit eine geringere Hirnmasse der Versuchstiere zurückzuführen ist. Ein Grund für die gesteigerte Apoptoserate ab dem Tag nach der PB-Injektion könnte das Medikament selbst sein, das heißt, dass durch seine Wirkmechanismen an verschiedenen Rezeptoren im Gehirn Nervenzellen unter Umständen so beeinflusst werden, dass sie ihren apoptotischen Zelltod einleiten. Es wäre aber auch denkbar, dass die gesteigerte Apoptoserate eine Folge der unerwünschten Arzneimittelwirkungen von PB, besonders von Atemdepression oder Sedierung (Cramer und Mattson 1995), ist und damit nur eine sekundäre Folge des Antiepileptikums.

Wang et al. (Wang et al. 2001) zeigten, dass eine Hypoxie bei sieben Tage alten Ratten zu einer Aktivierung der Caspase 3 als zentralem Enzym der Apoptose führte. Ebenso berichtet eine Arbeit von Daval et al. (Daval et al. 2004) über eine vorübergehende gesteigerte Apoptoserate im Hippocampus nach 20minütiger Hypoxie bei neugeborenen Ratten. Es wäre also möglich, dass in der vorliegenden Studie durch die atemdepressive Wirkung des PB bei den Tieren eine vorübergehende Mangelversorgung des Gehirns mit Sauerstoff vorhanden war, die wiederum zur Induktion der apoptotischen Neurodegeneration geführt haben könnte. Allerdings lässt sich diese Theorie nicht weiter untermauern, da es in der praktischen Durchführung der Studie nicht möglich war, die Sauerstoffsättigung im Blut der Tiere zu messen.

Eine weitere Theorie wäre die Steigerung der Apoptose als Folge der Mangeler ernährung in den Tagen nach der PB-Injektion. Es ist bekannt, dass besonders in dieser Zeit zwischen Geburt und P14 das Rattenhirn besonders empfindlich auf Mangeler ernährung reagiert und dadurch entstandene Schäden am Gehirn nur schwer kompensiert werden können (Kaufmann 2000). Feoli et al. (Feoli et al. 2006) fanden heraus, dass Mangeler ernährung bei

neugeborenen Ratten zu erheblichem oxidativem Stress im Gehirn geführt hatte. Dieser oxidative Stress wiederum kann eine Induktion der neuronalen Apoptose zur Folge haben (Harrison et al. 2005). Die temporäre Mangelernährung bei den Versuchstieren der vorliegenden Studie war eine Folge der Sedierung durch PB, wodurch die neugeborenen Ratten besonders am Tag der PB-Injektion und am Tag danach kaum Nahrung zu sich nahmen. Dies machte sich durch einen signifikanten Gewichtsunterschied zu den Kontrollgeschwistern bemerkbar, der allerdings möglicherweise noch dadurch verstärkt wurde, dass durch das seltene Säugen der Versuchstiere mehr Muttermilch für die Kontrolltiere vorhanden war, die dadurch schneller an Gewicht zunehmen konnten. Aus den oben erwähnten Studien kann man also schlussfolgern, dass auch die zeitweise Mangelernährung der Versuchstiere einen Einfluss auf die apoptotische Neurodegeneration gehabt haben könnte.

Eine weitere beobachtete Folge der Sedierung war bei einigen Tieren eine temporäre Hypothermie, die vermutlich durch die mangelnde Bewegung und damit unzureichende Wärmeproduktion durch die Muskulatur zustande kam. Zudem waren die sedierten Tiere, im Gegensatz zu ihren Kontrollgeschwistern, oft im Käfig verteilt und profitierten dadurch nicht von der Mutterwärme. Diese Hypothermie hätte allerdings, wenn überhaupt, dann eher einen protektiven Effekt auf die Apoptose gehabt, da verschiedenen Autoren bereits über neuroprotektive Effekte einer kontrollierten Hypothermie berichtet haben (Ohmura et al. 2005, Van Hemelrijck et al. 2003).

An P14 war die Apoptoserate der mit 87,5 mg PB/kg KG behandelten Tiere auf das Maß der Kontrolltiere abgesunken. Im weiteren Verlauf bis zum Endpunkt der Studie an P21 waren die Zahlen apoptotischer Zellen – mit der einzigen Ausnahme im Frontalcortex, in dem mit der TUNEL-Färbung vermehrt apoptotische Zellen nachweisbar waren – im Vergleich zu den Kontrolltieren weder erhöht noch erniedrigt. Das heißt also, dass es nach einem anfänglich scheinbar vermehrten Zellverlust durch Apoptose nicht zu einem Ausgleich durch nachfolgende verminderte Apoptoseraten im Vergleich zur Kontrollgruppe kam. Jedoch muss an dieser Stelle bemerkt werden, dass die Zellzahlen der Versuchsgruppe in aller Regel nicht unter denen der Kontrollgruppe lagen, so dass eine Ausgleichsreaktion gar nicht erforderlich gewesen wäre.

5.2 Diskussion der Methoden

Mit allen Methoden, das heißt Anfärbung von Hirnschnitten mit HE oder TUNEL und Messung der Caspase-3-Aktivität im Gehirn, ließ sich bei den Tieren der Kontrollgruppe ein Maximum der Apoptoserate an P8 mit einem nachfolgenden Abfall bis zu P21 nachweisen. Ebenso zeigten sich in allen drei Methoden keine signifikanten Unterschiede in der Apoptoserate zwischen der mit 50 mg PB/kg KG behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe, mit der einzigen Ausnahme an P8 im Frontalcortex. Dieser Unterschied zeigt sich allerdings nur in der TUNEL-Färbung, wodurch die Aussagekraft dieses Wertes beschränkt ist.

Übereinstimmungen in allen drei Methoden hinsichtlich einer signifikant erhöhten Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe ergaben sich bei der Gruppe, die 87,5 mg PB/kg KG injiziert bekommen hatte, nur an P11 im Thalamus.

In den anderen Hirnregionen und an anderen untersuchten Tagen konnten nur mit einer oder zwei Methoden gesteigerte Apoptoseraten bei den Versuchstieren nachgewiesen werden. Signifikant erhöhte Werte an P8 in der Caspase-3-Aktivität beispielsweise im Cerebellum korrelierten nicht mit den im Vergleich zur Kontrollgruppe unauffälligen Apoptoseraten in diesen Regionen, die sich aus der Auswertung der HE- und TUNEL-Färbung ergaben. Umgekehrt ließen sich erhöhte Apoptoseraten in der TUNEL-Färbung in Striatum, Parietalcortex und Thalamus nicht durch die beiden anderen Methoden bestätigen. Gesteigerte Apoptoseraten an P9 in der TUNEL-Färbung in Thalamus und Cerebellum ließen sich ebenfalls nicht durch signifikant erhöhte Werte in HE-Färbung oder Caspase-3-Assay untermauern. An P10 waren lediglich in der HE-Färbung vermehrt apoptotische Zellen im Cerebellum nachweisbar. An P11 gab es neben der erwähnten Übereinstimmung im Thalamus in allen drei Methoden erhöhte Apoptosewerte im Striatum und im Cerebellum sowohl in der TUNEL-Färbung als auch in der Caspase-3-Aktivität, nicht aber in der HE-Färbung. An P14 war in allen Hirnregionen übereinstimmend mit allen drei Nachweismethoden für Apoptose kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrollgruppe zu beobachten. An P21 ließ sich eine vermehrte apoptotische Neurodegeneration im Frontalcortex in der TUNEL-Färbung und im Caspase-3-Assay nachweisen, in den übrigen Hirnregionen wurden nur mittels Caspase-3-Assay erhöhte Werte gemessen.

Diese Differenzen der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Methoden haben ihre Ursache aller Wahrscheinlichkeit nach in den verschiedenen spezifischen Merkmalen der jeweiligen Nachweismethode für Apoptose.

Ein Nachteil bei der Messung der Caspase-3-Aktivität lag darin, dass bei dieser Methode das Gehirn nach makroskopischen Gesichtspunkten in die vier Anteile Frontalhirn, Stammganglien, Thalamus und Kleinhirn geteilt wurde. Dabei wurde das Gehirn durch Schnitte in der Frontalebene in vier etwa gleich große Teile getrennt. Möglicherweise wurden durch die zusammengefassten Hirnregionen gesteigerte Apoptoseraten in relativ kleinen Gebieten wie etwa dem Thalamus überdeckt und ausgeglichen durch normale Apoptoseraten in den übrigen Regionen dieses Querschnitts. Ein Vorteil gegenüber der TUNEL- und der HE-Färbung ist jedoch, dass mit dem Caspase-3-Assay bereits Apoptose detektiert werden kann, wenn sie noch nicht mit rein morphologischen Kriterien zu bestimmen ist (Stadelmann und Lassmann 2000).

Ein entscheidender Nachteil der TUNEL-Färbung ist, dass mit dieser Methode nicht nur DNA-Brüche während der apoptotischen Neurodegeneration dargestellt werden, sondern auch DNA-Brüche aufgrund von Nekrose oder DNA-Schäden durch die Aufarbeitung des Gewebes zu Hirnschnitten. Besonders die Gewebeschäden durch die Schnittanfertigung könnten ein Grund sein für die im Vergleich zur HE-Färbung häufiger nachgewiesenen vermehrten apoptotischen Zellen. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass nur in der Gruppe mit der supratherapeutischen PB-Dosierung vermehrt gesteigerte Apoptoseraten nachgewiesen wurden, in den anderen Gruppen jedoch so gut wie keine Unterschiede im Vergleich zur HE-Färbung auffielen.

Die HE-Färbung ist im Grunde eine sehr sensitive Methode zur Detektion von Apoptose, doch ist die Auswertung von gefärbten Gewebeschnitten zum Teil vom Auswertenden abhängig. So können mitotische Zellen oder Zellen mit kleinen kondensierten Zellkernen wie etwa Lymphozyten oder Oligodendrozyten unter Umständen mit apoptotischen Zellen verwechselt werden. Doch trotzdem bleiben die morphologischen Merkmale kondensierter Zellkern und Fragmentation sehr spezifisch für die Apoptose, so dass Verwechslungen in aller Regel selten sind (Stadelmann und Lassmann 2000).

Ein Nachteil sowohl der HE- als auch der TUNEL-Färbung war, dass nur wenige Gewebeschnitte pro Gehirn angefertigt und somit ausgewertet wurden. Die Ergebnisse dieser Methoden stellen also nur einen kleinen Ausschnitt des Gehirns dar, der nicht uneingeschränkt Rückschlüsse auf die gesamte jeweilige Struktur zulässt. Dennoch kann

man sagen, dass repräsentative Hirnregionen ausgewählt wurden und eine statistisch ausreichende Anzahl von Tieren untersucht wurde. Zudem werden die Zahlen von den Ergebnissen aus der Messung der Caspase-3-Aktivität, die jeweils im gesamten Anteil des Gehirns gemessen wurde, unterstützt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass jede der beschriebenen Nachweismethoden neben ihren jeweiligen Vorteilen auch ihre Nachteile hat und mit gewissen Fehlern behaftet ist. Eine Kombination der verschiedenen Methoden und eine Auswertung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der möglichen Fehlerquellen minimiert allerdings die Fehlerwahrscheinlichkeit bei der Interpretation der Ergebnisse so weit wie möglich, so dass eine relativ hohe Aussagekraft zustande kommt.

6. Schlussfolgerungen

Sieben Tage alte Wistar-Ratten bekamen entweder 50 mg PB/kg KG oder 87,5 mg PB/kg KG bzw. die Trägerlösung ohne Wirkstoff injiziert. An P8, P9 P10, P11, P14 oder P21 wurden jeweils 10 Tiere pro Gruppe getötet und das Gehirn auf die Anzahl apoptotischer Zellen mittels HE-Färbung untersucht.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass bei einer Einmalgabe von 50 mg PB/kg KG keine Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten waren. Bei dieser Dosierung werden PB-Serumspiegel erreicht, die in etwa dem therapeutischen Bereich entsprechen, mit dem neugeborene Kinder zur Anfallsunterbrechung bei Neugeborenenkrämpfen behandelt werden.

Nach einer Einmalgabe von 87,5 mg PB/kg KG an P7 zeigten sich innerhalb der darauffolgenden vier Tage (P8–P11) in einigen Hirnregionen signifikant erhöhte Zahlen apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ab P14 unterschied sich die Apoptoserate im Großen und Ganzen nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe. Trotz der anfänglich erhöhten Apoptoserate waren jedoch an kaum einem der untersuchten Tage Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe hinsichtlich der Gesamtzellzahlen in den einzelnen Hirnregionen festzustellen. Die Serumspiegel bei dieser Dosierung lagen dabei über dem therapeutischen Bereich für neugeborene Ratten und entsprechen auch therapeutischen Serumspiegeln für neugeborene Kinder.

Für das Tiermodell lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass bei therapeutischen Dosierungen keine Steigerung der neuronalen Apoptoserate bis zu 14 Tage nach einer einmaligen PB-Applikation auftraten. Spätestens eine Woche nach PB-Injektion lag die Anzahl apoptotischer Zellen bis auf wenige Ausnahmen wieder im physiologischen Bereich und auch davor war die Apoptoserate nicht in allen Regionen signifikant erhöht. Somit sind bei einer supratherapeutischen PB-Dosis langfristig wahrscheinlich keine erheblichen Auswirkungen auf die apoptotische Neurodegeneration zu erwarten,. Zudem ist von keinem relevanten Nervenzellverlust durch vermehrte Apoptose auszugehen, da die Anzahl der Gehirnzellen fast immer auf dem Niveau der Kontrolltiere lag und auch das Hirngewicht nicht dauerhaft vermindert blieb im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Für die klinische Anwendung von PB beim Menschen bei Neugeborenenkrämpfen können nur schwer ähnliche Schlüsse gezogen werden. Der Grund hierfür ist, dass sich bereits im Tiermodell die Versuchsdaten kaum von einem Rattenstamm auf den anderen übertragen

lassen. Somit ist es fraglich, inwieweit Schlussfolgerungen auf den Menschen zulässig sind. Zudem ist anzumerken, dass der untersuchte Zeitraum bei Ratten (P7-P21), der die vulnerable Phase der Hirnentwicklung abdeckt, beim Menschen wesentlich länger dauert. Er erstreckt sich von etwa drei Monaten vor bis zu einigen Jahren nach der Geburt. Das heißt, dass theoretisch auch schon hohe PB-Dosen bei der Mutter mit entsprechend hohen Serumspiegeln möglicherweise zu einer Steigerung der neuronalen Apoptoserate des Feten führen können. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die Phase mit gesteigertem Zelluntergang durch Apoptose nach einer toxischen PB-Dosis beim Menschen um einiges länger als nur sieben Tage wie bei der Ratte dauert. Das könnte wiederum zur Folge haben, dass es beim Menschen aufgrund der länger andauernden gesteigerten Apoptoserate zu einem Nettoverlust an Neuronen kommt. Andererseits können beim Menschen die unerwünschten Arzneimittelwirkungen besser kontrolliert werden. So lässt sich beispielsweise Mangelernährung und Unterkühlung als Folge der Sedierung durch eine entsprechende Betreuung weitgehend verhindern. Somit ließen sich diese Faktoren als mögliche Ursache einer Apoptosesteigerung im Gehirn weitgehend ausschließen.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass es erst bei einer supratherapeutischen PB-Dosis am 7. Lebenstag am 8., 9. und 11. Tag teilweise zu einer signifikanten Erhöhung apoptotischer Neurodegeneration kommt. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen der durch die Caspase-3-Aktivität gemessenen Apoptoserate. Zudem führt die Gabe einer therapeutischen sowie einer supratherapeutischen PB-Einmaldosis bei neonatalen Ratten zu keinem Hirnzellverlust nach bis zu 14 Tagen Beobachtungsdauer.

Mit dieser Studie waren die alarmierenden Ergebnisse der Arbeit von Bittigau et al. (Bittigau et al. 2002) demzufolge nicht reproduzierbar. Trotzdem sollte man sich bei dem therapeutischen Einsatz von Phenobarbital bei Neugeborenen möglicher negativer Auswirkungen auf die neuronale Entwicklung bewusst sein und das Medikament weiterhin nur unter den Voraussetzungen der strengen Indikationsstellung, der regelmäßigen Kontrolle der PB-Serumspiegel und möglichst kurzer Therapiedauer anwenden. Des Weiteren bleibt abzuwarten, was Studien zu einer längeren Therapie mit PB ergeben. Außerdem bleibt die Frage zu klären, in wie weit genetische Unterschiede eine Rolle bei der Apoptoseinduktion durch PB eine Rolle spielen, wozu noch weitere Tierversuche notwendig sein werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Anderson GD, Levy RH. 1995. Phenobarbital. Chemistry and biotransformation. In: Antiepileptic Drugs, Hrsg. Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS. 4. Aufl. New York: Raven Press, 371-377.
2. Bartmann P, Roos R. 2002. Erkrankungen in der Neugeborenenperiode. In: Pädiatrie, Hrsg. Sitzmann FC. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme, 71-126.
3. Bittigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E, Pospischil D, Govindarajalu S, Dzietko M, Pesditschek S, Mai I, Dikranian K, Olney JW, Ikonomidou C. 2002. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Proc Natl Acad Sci U S A, 99 (23):15089-15094.
4. Bonfoco E, Ankarcrona M, Krainc D, Nicotera P, Lipton AL. 1997. Techniques for distinguishing apoptosis from necrosis in cerebrocortical and cerebellar neurons. In: Apoptosis Techniques and Protocols, Hrsg. Poirier J. 1. Aufl. Totowa, New Jersey: Humana Press, 237-253.
5. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72:248-254.
6. Bührdel P, Willgerodt H, Keller E, Theile H. 1978. Postnatal development of rats born preterm and postterm. I. Body weight. Biol Neonate, 33 (3-4):184-188.
7. Burek MJ, Oppenheim RW. 1996. Programmed cell death in the developing nervous system. Brain Pathol, 6 (4):427-446.
8. Cramer JA, Mattson RH. 1995. Phenobarbital. Toxicity. In: Antiepileptic Drugs, Hrsg. Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS. 4. Aufl. New York: Raven Press, 409-420.
9. Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. 2003. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. Immunol Rev, 193:10-21.
10. Daval JL, Pourie G, Grojean S, Lievre V, Strazielle C, Blaise S, Vert P. 2004. Neonatal hypoxia triggers transient apoptosis followed by neurogenesis in the rat CA1 hippocampus. Pediatr Res, 55 (4):561-567.
11. Dessens AB, Cohen-Kettenis PT, Mellenbergh GJ, Koppe JG, van De Poll NE, Boer K. 2000. Association of prenatal phenobarbital and phenytoin exposure with small head size at birth and with learning problems. Acta Paediatr, 89 (5):533-541.
12. Dodson WE, Rust RS. 1995. Phenobarbital. Absorption, distribution, and excretion. In: Antiepileptic Drugs, Hrsg. Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS. 4. Aufl. New York: Raven Press, 379-387.

13. Farwell JR, Lee YJ, Hirtz DG, Sulzbacher SI, Ellenberg JH, Nelson KB. 1990. Phenobarbital for febrile seizures--effects on intelligence and on seizure recurrence. *N Engl J Med*, 322 (6):364-369.
14. Feoli AM, Siqueira IR, Almeida L, Tramontina AC, Vanzella C, Sbaraini S, Schweigert ID, Netto CA, Perry ML, Goncalves CA. 2006. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition*, 22 (2):160-165.
15. Ferrer I, Serrano T, Soriano E. 1990a. Naturally occurring cell death in the subicular complex and in hippocampus in the rat during development. *Neuroscience Research*, 8:60-66.
16. Ferrer I, Bernet E, Soriano E, Del Rio T, Fonseca M. 1990b. Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience*, 39:451-458.
17. Ferrer I, Tortosa A, Blanco R, Martín F, Serrano T, Planas A, Macaya A. 1994. Naturally occurring cell death in the developing cerebral cortex of the rat. Evidence of apoptosis-associated internucleosomal DNA fragmentation. *Neuroscience Letters*, 182:77-79.
18. Feuerstein TJ. 2005. Antikonvulsiva, Konvulsiva - Pharmakotherapie der Epilepsien. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Hrsg. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. 9. Aufl. München: Urban&Fischer,
19. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119 (3):493-501.
20. Geiger KD, Bloom FE, Sarvetnick NE. 1997. Methods for detection of apoptosis in the CNS. In: Apoptosis Techniques and Protocols, Hrsg. Poirier J. 1. Aufl. Totowa, New Jersey: Humana Press, 217-235.
21. Gould E, Woolley CS, McEwen BS. 1991. Naturally occurring cell death in the developing dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol*, 304 (3):408-418.
22. Gschwind M, Huber G. 1997. Detection of apoptotic or necrotic death in neuronal cells by morphological, biochemical and molecular analysis. In: Apoptosis Techniques and Protocols, Hrsg. Poirier J. 1. Aufl. Totowa, New Jersey: Humana Press, 13-31.
23. Harrison JF, Hollensworth SB, Spitz DR, Copeland WC, Wilson GL, LeDoux SP. 2005. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Res*, 33 (14):4660-4671.
24. Hoffmeister H, Ablauf der Apoptose im Gewebe - schematisch [Online im Internet]. <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Apoptose-german.png> (Stand: 20. Februar 2007).
25. Horn F, Krüger K. 2003. Biochemie des Menschen. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme.

26. Kaufmann W. 2000. Developmental neurotoxicity. In: The laboratory rat, Hrsg. Krinke. 1. Aufl. London: Academic Press, 227-250.
27. Löffler G, Petrides PE. 2003. Biochemie und Pathobiochemie. 7. Aufl. Berlin: Springer.
28. Mooney SM, Miller MW. 2000. Expression of bcl-2, bax, and caspase-3 in the brain of the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res*, 123 (2):103-117.
29. Morselli PL. 1993. Pharmacokinetics in Infancy, Childhood, and Adolescence. In: The Treatment of Epilepsy: Principles and Practice, Hrsg. Wyllie E. 1. Aufl. Philadelphia: Lea & Febiger, 752-768.
30. Morton DB, Griffiths PH. 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec*, 116 (16):431-436.
31. Ohmura A, Nakajima W, Ishida A, Yasuoka N, Kawamura M, Miura S, Takada G. 2005. Prolonged hypothermia protects neonatal rat brain against hypoxic-ischemia by reducing both apoptosis and necrosis. *Brain Dev*, 27 (7):517-526.
32. Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Farber NB, Bittigau P, Ikonomidou C. 2002. Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol*, 12 (4):488-498.
33. Oppenheim RW. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 14:453-501.
34. Painter JP, Gaus LM. 1993. Phenobarbital. In: The Treatment of Epilepsy: Principles and Practices, Hrsg. Wyllie E. 1. Aufl. Philadelphia: Lea & Febiger, 900-908.
35. Painter JP, Gaus LM. 1995. Phenobarbital. Clinical Use. In: Antiepileptic Drugs, Hrsg. Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS. 4. Aufl. New York: Raven Press, 401-407.
36. Paxinos G, Watson C. 1998. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4. Aufl. San Diego, California: Acad. Press, 1998.
37. Prichard JW, Ransom BR. 1995. Phenobarbital. Mechanisms of action. In: Antiepileptic drugs, Hrsg. Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS. 4. Aufl. New York: Raven Press, 359-369.
38. Schwabe D, Ahrens A, Staib AH. 2001. Arzneimittelanwendungen im Kindesalter. In: Klinische Pharmakologie, Hrsg. Rietbrock N, Staib AH, Loew D. 4. Aufl. Darmstadt: Steinkopff Verlag, 98-122.
39. Stadelmann C, Lassmann H. 2000. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res*, 301 (1):19-31.

40. Sulzbacher S, Farwell JR, Temkin N, Lu AS, Hirtz DG. 1999. Late cognitive effects of early treatment with phenobarbital. *Clin Pediatr (Phila)*, 38 (7):387-394.
41. Van Hemelrijck A, Vermijlen D, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. 2003. Effect of resuscitative mild hypothermia on glutamate and dopamine release, apoptosis and ischaemic brain damage in the endothelin-1 rat model for focal cerebral ischaemia. *J Neurochem*, 87 (1):66-75.
42. Verspohl EJ. 2001. Antiepileptika. In: *Arzneimittelneben- und -wechselwirkungen*, Hrsg. Ammon HPT. 4. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 514-541.
43. Wang X, Karlsson JO, Zhu C, Bahr BA, Hagberg H, Blomgren K. 2001. Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biol Neonate*, 79 (3-4):172-179.

8. Anhang

8.1 TUNEL-Färbung

Neugeborenen Wistar-Ratten wurde an P7 50 oder 87,5 mg PB/kg KG bzw. NaCl als Kontrolllösung intraperitoneal injiziert. An den Tagen P8, P9, P10, P11, P14 und P21 erfolgte die Tötung von jeweils zehn Tieren pro Gruppe und anschließende Hirnentnahme. Aus Material der rechten Hemisphäre wurden Hirnschnitte angefertigt und mit TUNEL angefärbt. Kerne apoptotischer Zellen stellten sich in der TUNEL-Färbung dunkelbraun dar. Im Gegensatz dazu waren intakte Nervenzellen nicht angefärbt und somit gut zu unterscheiden von zu Grunde gehenden Zellen.

Die Apoptoserate zeigte in der Kontrollgruppe an den gemessenen Tagen ein Maximum an P8. An den folgenden Tagen fiel die Anzahl apoptotischer Zellen bis zum Tag P21 ab.

In der mit 50 mg PB/kg KG behandelten Gruppe zeigte sich ein ähnlicher Verlauf, wie in der Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede zeigten sich nur an P8 im Frontalcortex.

Bei den Tieren, die 87,5 mg PB/kg KG erhalten hatten, wurden im Gehirn mehr apoptotische Zellen gezählt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe waren allerdings nicht in allen Hirnregionen nachweisbar. An P8 ergaben sich Unterschiede in der Apoptoserate auf Signifikanzniveau zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe mit 87,5 mg PB/kg KG in den Regionen Striatum, Parietalcortex und Thalamus. An P9 war in den Regionen Thalamus und Cerebellum die Zahl apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. An P11 ergab sich nur im Thalamus eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in der Versuchsgruppe. An P21 schließlich war nur im Frontalcortex eine signifikant gesteigerte Apoptoserate nachweisbar.

8.2 Caspase-3-Aktivität

Neugeborenen Wistar-Ratten wurde an P7 50 oder 87,5 mg PB/kg KG bzw. NaCl als Kontrolllösung intraperitoneal injiziert. An den Tagen P8, P9, P10, P11, P14 und P21 erfolgte die Tötung von jeweils zehn Tieren pro Gruppe und anschließende Hirnentnahme. Aus Hirnmaterial der linken Hemisphäre wurde in den vier Abschnitten Frontalhirn (A), Stammganglien (B), Thalamus (C) und Kleinhirn (D) mittels fluorometrischer Messung die

Aktivität der Caspase 3 bestimmt. In der Kontrollgruppe zeigte die Caspase-3-Aktivität, die ein indirektes Maß für die Apoptoserate darstellt, im Gesamtdurchschnitt des Gehirns eine Abnahme von P8 ($9,51 \pm 1,76$ nmol/g Protein/min) bis P21 ($6,25 \pm 0,39$ nmol/g Protein/min). Dieser Verlauf der Apoptoserate zeigte sich auch bei der Untersuchung der einzelnen Hirnabschnitte.

Die mit 50 mg PB/kg KG behandelten Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe. In dieser Gruppe lag die Aktivität an P8 im Gesamtdurchschnitt bei $10,53 \pm 0,84$ nmol/g Protein/min und fiel bis zu P21 auf $6,10 \pm 0,32$ nmol/g Protein/min ab.

Die mit 87,5 mg PB/kg KG behandelten Tiere zeigten wie die Tiere der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe mit 50 mg PB/kg KG ein Maximum der Caspase-3-Aktivität an P8 und einen Abfall der Aktivität bis zu P21. Jedoch wiesen die Tiere mit der Dosierung 87,5 mg PB/kg KG zum Teil signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Besonders an P8 zeigte sich in den einzelnen Regionen A-D und im Gesamtdurchschnitt der vier Regionen eine signifikante Erhöhung der Caspase-3-Aktivität von. An P9 und P14 waren in der Aktivität der Caspase 3 keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachweisbar. An P10 zeigten sich Unterschiede in der Region A, an P11 in den Regionen B, C, D und im Mittelwert aller vier Regionen und an P21 waren wie an P8 erhöhte Werte in den Regionen A-D sowie im Mittelwert nachweisbar.

9. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. U. Brandl

Dr. med. R. Husain,

die Hilfe des Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Neuburg, den 1. September 2009

Barbara Merkle